

A.C.CAMARGO CANCER CENTER
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MICROBIOTA NO DESENVOLVIMENTO DE FÍSTULAS
ANASTOMÓTICAS EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

LAIS FERNANDA ALCARDE

Tese de Doutorado, apresentada à Fundação Antônio Prudente como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto

Co-orientadora: Dra. Diana Noronha Nunes

Co-orientador: Dr. Samuel Aguiar Jr.

São Paulo
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Alcarde, Lais .

Avaliação do papel da microbiota no desenvolvimento de fístulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal. / Lais Alcarde. São Paulo, 2025.

159f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto.

1. Fístula Anastomótica, 2. Microbiota, 3. Disbiose

CDU 616

Elaboração eletrônica pela Biblioteca A.C.Camargo - Fundação Antônio Prudente.

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica – PRONON/SISPAR, através de auxílio à Pesquisa - 08/2021 – 09/2025. 2500.055-167/2015-23.

DEDICATÓRIA

A todos os participantes do estudo, que mesmo em um momento de incerteza frente ao diagnóstico de câncer colorretal, aceitaram de forma generosa, participar e colaborar com este trabalho. Minha sincera gratidão pela confiança e contribuição essencial para que esta pesquisa se tornasse viável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, pela força que sempre me concedeu, pela serenidade nos momentos difíceis e por colocar em meu caminho pessoas que se tornaram verdadeiros anjos ao longo desta jornada do doutorado que foi marcada por grande aprendizado pessoal e profissional.

À minha família, de sangue e amigos, obrigada pelo carinho, apoio e por estarem sempre na torcida para que tudo se encaminhasse com tranquilidade. Ao meu esposo **Augusto**, meu companheiro de vida, pela paciência e apoio em cada etapa desta jornada. Ao meu pai, **Antônio**, pelo cuidado e incentivo expressos nos pequenos gestos do dia a dia, seu carinho me incentivava a ser uma pessoa melhor. E à minha mãe, **Inez**, que mesmo no seu momento mais difícil de vida ainda encontrou palavras de motivação, sempre torcendo por mim. E em especial à **Duda**, por me ajudar a enfrentar os desafios do cotidiano quando tudo parecia pesado demais. Serei eternamente grata à Deus ter colocado você na minha vida.

Aos meus sobrinhos, **Livia e Felipe**, que enchem minha vida de alegria e amor. Acompanhar cada passo do crescimento de vocês é um presente que torna meus dias mais leves e me lembra, sempre, o que realmente tem importa. Tia Laís ama muito vocês!

Ao meu orientador, **Dr. Emmanuel Dias-Neto**, sou profundamente grata não apenas pela orientação científica e pela confiança depositada em mim, mas principalmente pelo carinho e cuidado comigo ao longo desses quatro anos. Em um período em que os desafios ultrapassaram o âmbito acadêmico, conciliar trabalho, doutorado e vida familiar só foi possível graças à sua compreensão e sensibilidade. Estendo meu agradecimento à minha coorientadora **Dra. Diana Noronha Nunes**, que sempre compartilhou da mesma sensibilidade e esteve disponível e atenciosa, sanando minhas dúvidas e trazendo motivação e entusiasmo ao projeto.

Ao **Dr. Alexandre Defelicibus**, agradeço imensamente pela aplicação dos filtros de qualidade nos dados após o sequenciamento e pelas análises de genes de resistência. Agradeço ainda pelo apoio nas análises em R, pela paciência em explicar os diferentes raciocínios por trás de cada comando e pela gentileza com que sempre esclareceu minhas dúvidas. Sua contribuição foi muito além do suporte ao uso do R, oferecendo discussões valiosas sobre metagenômica, em um momento em que o grupo de Genômica Médica já não estava mais presente no hospital. Registro também meu agradecimento ao **Dr. Israel Tojal da**

Silva, sempre solícito e disposto a discutir meus resultados, trazendo ideias e sugestões de melhorias que enriqueceram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Setúbal**, por ter se prontificado, com tamanha gentileza e paciência, a esclarecer até mesmo as dúvidas mais simples nas análises de genes de resistência antimicrobiana. Sua colaboração foi essencial para a obtenção de dados confiáveis.

Ao meu grupo Genômica Médica, por todos os aprendizados. As técnicas **Gabriela Branco**, **Luana Batista** e **Katia Klug Oliveira**, pela ajuda fundamental nos primeiros ensaios de biologia molecular e pela amizade construída no dia a dia. À **Dra. Thais Bartelli**, pelas contribuições valiosas no entendimento da metagenômica e pelo entusiasmo em compartilhar conhecimento. E a **Dra. Teresa Gusmão**, pela amizade e companheirismo, que tornaram os dias mais leves com nossas inúmeras conversas sobre nossos bichinhos.

A toda a equipe médica e de enfermagem do **Núcleo de Cirurgia Colorretal**, agradeço o apoio nas coletas das amostras e dados clínicos dos pacientes. Ao **Dr. Samuel Aguiar Jr.**, por ter trazido ao nosso grupo a importância de investigar o desfecho de fístulas em pacientes com câncer colorretal, ajudando a definir o desenho do estudo e a seleção/pareamento entre casos e controles, tendo contribuído para viabilizar a realização deste projeto. Em especial, à enfermeira de pesquisa **Bruna Elisa Catin Kupper**, que esteve à frente da organização da base de dados e do recrutamento dos pacientes.

À equipe da **Anatomia Patológica**, meu muito obrigada pelo apoio fundamental nas coletas e pelo auxílio para viabilizar este trabalho. Em especial, ao **Dr. Gabriel Oliveira dos Santos**, sempre gentil e disposto a mobilizar a equipe, e ao residente **Rodrigo Fonseca Abreu**, sua colaboração foi essencial para o andamento deste estudo. Agradeço também aos técnicos **Maristela Aquino** e **Alexandre Liberio**, que mesmo diante das dificuldades logísticas nas coletas, estiveram sempre disponíveis e dispostos a ajudar.

À equipe do **Biobanco** do A.C.Camargo Cancer Center, em especial à **Louise Danielle de Carvalho Mota** e à **Ana Paula Mitsue Suenaga Silva**, agradeço pela leveza e simpatia que tornaram nosso convívio tão agradável. Foi um privilégio conhecer vocês.

À **Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo**, deixo um agradecimento especial pelo acolhimento dentro do seu grupo de pesquisa, não permitindo que eu me sentisse sozinha nessa jornada, assim com à **Carolinne Alves de Oliveira**, amizade foi uma constante nesses anos.

À **Dra. Mariana Brait**, pela disponibilidade e pela clareza com que me auxiliou nas questões da pós-graduação, sempre que surgiram dúvidas ou dificuldades.

À **Dra. Dirce Maria Carraro**, por ter assumido a responsabilidade institucional após a saída do meu orientador e pela segurança de saber que poderia contar com seu apoio sempre que necessário. E à **Ana Carolina Kerekes Miguez**, pela paciência e disponibilidade em tantas ocasiões, me ajudando a compreender os desafios de uma qPCR.

A todas as **funcionárias da Pós-Graduação, escritório de projetos e Centro Internacional de Pesquisa e Ensino** pela presteza, competência e auxílio que foram essenciais para o bom funcionamento deste doutorado.

Ao **Programa de Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center**, pelo suporte acadêmico dado a todos os discentes.

Ao **Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON)**, pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste projeto.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

RESUMO

Alcarde LF. **Avaliação do papel da microbiota no desenvolvimento de fístulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal.** [Tese - Doutorado]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Fístulas anastomóticas (FA) são complicações pós-operatórias graves e relativamente frequentes em pacientes submetidos à cirurgia para câncer colorretal (CCR), estando associadas ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade, maior tempo de internação e atrasos no tratamento adjuvante. Apesar de diversos fatores de risco já descritos, os mecanismos envolvidos na formação das FA permanecem pouco compreendidos, com dados muitas vezes conflitantes na literatura. Estudos recentes têm destacado o papel potencial da microbiota intestinal nos desfechos cirúrgicos, dado o seu envolvimento na modulação de processos inflamatórios, resposta imunológica, cicatrização tecidual e alterações em sua composição têm sido associadas a diferentes desfechos cirúrgicos e podem contribuir para o desenvolvimento das FA. Neste estudo, foram avaliadas variáveis clínicas, epidemiológicas e microbianas em pacientes com CCR submetidos à colectomia, comparando aqueles que desenvolveram FA com aqueles sem essa complicação. Buscando contribuir com a melhor compreensão deste desfecho avaliamos a microbiota total, a partir de amostras de fezes coletadas antes e após a terapia antimicrobiana e cirúrgica, usando sequenciamento total de DNA (*shotgun metagenomics*). O período pós-operatório, foi caracterizado por maior frequência de complicações nos casos com FA, incluindo reoperações, necessidade de suporte intensivo e nutrição parenteral. A microbiota teve um perfil global semelhante entre os grupos, porém com a persistência, após antibioticoterapia profilática, de algumas bactérias, tais como *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum*. Esses achados ocorreram sem diferenças significativas nos perfis genéticos de resistência entre os grupos, sugerindo que a resposta clínica pode ser modulada por mecanismos como biofilmes, metabolismo de fármacos ou variações individuais. A análise multivariada reforçou *P. micra* como possível biomarcador associado à FA. Os resultados reforçam a importância de estratégias terapêuticas mais individualizadas, capazes de integrar variáveis clínicas e microbianas, além de sugerirem potenciais benefícios no rastreamento pré-operatório de fontes de translocação bacteriana, como infecções, uso de inibidores de bombas de próton ou tratamentos odontológicos.

Palavras-chave: Câncer Colorretal. Fístula Anastomótica. Microbiota. Disbiose.

ABSTRACT

Alcarde LF. **Assessment of the Role of the Microbiota in the Development of Anastomotic Leakage in Patients with Colorectal Cancer.** [Tese - Doutorado]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Anastomotic leakage (AL) is a serious and relatively frequent postoperative complication in patients undergoing surgical resection for colorectal cancer (CRC), and are associated with increased morbidity and mortality rates, prolonged hospitalization, and delays in adjuvant therapy. Although several risk factors have been described, the underlying mechanisms leading to AL remain unclear, and the literature often presents conflicting evidence. Recent studies have highlighted the potential role of the gut microbiota in surgical outcomes, given its involvement in modulating inflammatory processes, immune response, tissue healing and alterations in microbial composition have been linked to various surgical outcomes and may contribute to the development of AL. To enhance the understanding of this outcome, we evaluated the whole genome using fecal samples collected before and after antimicrobial therapy and surgery, employing shotgun metagenomics. The postoperative period was characterized by a higher frequency of complications in cases with anastomotic leakage, including reoperations, intensive care support, and parenteral nutrition. The overall microbiota profile was similar between groups; however, after prophylactic antibiotic therapy, certain bacteria such as *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum* persisted. These findings occurred without significant differences in resistance gene profiles between groups, suggesting that clinical outcomes may be modulated by mechanisms such as biofilm formation, drug metabolism, or individual variation. Multivariate analysis further supported *P. micra* as a potential biomarker associated with anastomotic leakage. The results underscore the importance of more individualized therapeutic strategies capable of integrating clinical and microbial variables and suggest potential benefits of preoperative screening for sources of bacterial translocation, such as infections, proton pump inhibitor use, or dental treatments.

Keywords: Colorectal cancer. Anastomotic leakage. Gut microbiota. Dysbiosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos de resistência antimicrobiana.	31
Figura 2: Distribuição dos pacientes nos Grupos de Estudo (GE).	48
Figura 3: Curvas de saturação das amostras sequenciadas.	61
Figura 4: Análise comparativa da diversidade alfa entre casos e controles (GE2).	65
Figura 5: Análise de diversidade alfa a nível de espécies, para casos e controles do GE2.	67
Figura 6: Diversidade beta entre casos e controles do GE2.	69
Figura 7: Distribuição de táxons classificados por abundância relativa em diferentes níveis taxonômicos do GE2.	74
Figura 8: Distribuição dos táxons com abundância diferencial nos diferentes níveis taxonômicos identificados após terapia antimicrobiana (GE2).	85
Figura 9: Táxons diferencialmente abundantes em pacientes que necessitaram reintervenção cirúrgica após terapia antimicrobiana (GE2).	86
Figura 10: Distribuição das espécies bacterianas com potencial para produção de collagenases entre os grupos casos e controles do GE2.	90
Figura 11: Espécies bacterianas com potencial para produção de collagenases do GE2.	91
Figura 12: Gêneros bacterianos com potencial para produção de collagenases do GE2.	92
Figura 13: Análise de dissimilaridade entre os grupos caso e controle do GE2.	95
Figura 14: Distribuição dos genes de resistência antimicrobianos por amostra (GE2).	97
Figura 15: Abundância relativa dos genes de resistência antimicrobianos distribuídos por amostra (GE2).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fatores de risco associado ao desenvolvimento de FA.....	19
Tabela 2: Agrupamento dos pacientes recrutados – Grupos de Estudo (GE)	49
Tabela 3: Amostras coletadas ao longo do estudo.....	50
Tabela 4: Características gerais dos 69 pacientes recrutados pelo estudo (GE1).	52
Tabela 5: Dados oncológicos, terapêuticos e cirúrgicos dos pacientes do estudo (GE1).....	54
Tabela 6: Desfechos clínicos secundários e suporte terapêutico dos pacientes submetidos à cirurgia colorretal (GE1).....	56
Tabela 7: Modulação nutricional prévia e pós cirurgia colorretal (GE1).....	57
Tabela 8: Hábitos alimentares dos 81 indivíduos participantes do estudo (GE3).....	58
Tabela 9: Dados genômicos gerais obtidos no sequenciamento shotgun (GE1).	59
Tabela 10: Dados metagenômicos intra-grupos quando separados por momento de coleta (GE2).	60
Tabela 11: Diferentes níveis taxonômicos identificados nas 142 amostras sequenciadas.	63
Tabela 12: Valores de p encontrados na diversidade alfa através do teste Wilcoxon (GE2)....	64
Tabela 13: Distribuição dos táxons por nível taxonômico e faixas de abundância relativa (GE2).	72
Tabela 14: Os 10 táxons mais frequentes (acima de 1%), a nível taxonômico na coleta anterior a antibioticoterapia (GE2).....	76
Tabela 15: Os 10 táxons mais frequentes (acima de 1%) a nível taxonômico na coleta posterior a antibioticoterapia (GE2).....	77
Tabela 16: Tabela 15: Táxons com diferenças de abundância relativa estatisticamente significativas (teste de Wilcoxon) (GE2).....	79
Tabela 17: Perfil microbiológico de táxons suscetíveis a profilaxia antimicrobiana com neomicina e metronidazol (GE2).	89
Tabela 18: Perfil exclusivo de táxons no grupo caso ou controle (GE2).....	93
Tabela 19: Abundância relativa dos genes de resistência antimicrobiana (GE2). O teste não paramétrico Wilcoxon foi utilizado para verificar a existência de diferença com significado estatístico entre os grupos quando $p \leq 0,05$	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
ACCCC	A.C.Camargo Cancer Center
ACS	American Cancer Society
AIE	Anti-inflamatório Esteroidal
AMR	Análise de Resistência Antimicrobiana
ANI	Identidade Média de Nucleotídeos (ANI, do inglês Average Nucleotide Identity)
ANOSIM	Análise de Similaridades (do inglês, Analysis of Similarities)
ASA	Sociedade Americana de Anestesiologistas (do inglês, American Society of Anesthesiologists)
BRACKEN	Reestimativa Bayesiana de Abundância após Classificação com o Kraken (do inglês, Bayesian Reestimation of Abundance after Classification with Kraken)
C1	Coleta 1 - antes da antibioticoterapia
C2	Coleta 2 - após a antibioticoterapia
Ca	Grupo Caso
CARD	Banco Abrangente de Resistência a Antibióticos (do inglês, Comprehensive Antibiotic Resistance Database)
CCR	Câncer Colorretal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa
Cmax	Concentração Plasmática Máxima
Co	Grupo Controle
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRC	Colorectal Cancer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic Acid)
ETM	Excisão Total do Mesorreto
FA	Fístulas Anastomóticas
FDR	Taxa de Descobertas Falsas (do inglês, False Discovery Rate)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IMC	Índice de Massa Corporal
ISREC	Grupo Internacional de Estudo do Câncer Retal (do inglês, International Study Group of Rectal Cancer)
MaAsLin2	Associações Multivariadas do Microbioma com Modelos Lineares (do inglês, Microbiome Multivariable Associations with Linear Models).
MDS	Escalonamento Multidimensional (do inglês, Multidimensional Scaling)

Min	Minutos
ml	Microlitro
mm	Milímetros
MMP-9	Metaloproteinases da Matriz
NA	Bactéria não identificada
NDARO	Repositório Nacional de Observação de Genes de Resistência a Antimicrobianos (do inglês, National Database of Antibiotic Resistant Organisms)
ng	Nanograma
NPT	Nutrição Parenteral Total
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de Base
PCoA	Análise de Coordenadas Principais (do inglês, Principal Coordinates Analysis)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
PERMANOVA	Análise de Variância Multivariada Permutacional (do inglês, Permutational Multivariate Analysis of Variance)
PIM	Preparação Mecânica do Intestino
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, Reactive Oxygen Species)
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
SCFA	Ácidos Graxos de Cadeia Curta (do inglês, Short-Chain Fatty Acids)
Seg	Segundos
SNG	Sonda Nasogástrica
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.2	Câncer Colorretal	16
1.3	Fístulas anastomóticas (FAs)	18
1.3.1	FATORES DE RISCO.....	19
1.4	Impacto de fístulas anastomóticas (FAs): aspectos financeiros, tempo de internação, complicações no tratamento e sobrevida	24
1.5	Microbiota intestinal	26
1.6	Técnicas para estudo da microbiota.....	33
1.7	Fístulas anastomóticas (FAs) e microbiota fecal	34
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Geral.....	40
2.2	Específicos.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Considerações éticas.....	41
3.2	População de estudo e agrupamento para análise.....	41
3.3	Critérios de inclusão.....	42
3.4	Critérios de exclusão	42
3.5	Desfecho principal.....	42
3.6	Desfechos secundários.....	43
3.7	Coleta de dados clínicos e epidemiológicos	43
3.8	Coleta e processamento do material biológico	44
3.9	Extração de ácidos nucleicos (DNA).....	45
3.10	Sequenciamento de DNA total (<i>shotgun</i>)	45
3.10.1	PROCESSAMENTO, FILTRAGEM E ANÁLISES DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS	46
3.10.2	ANÁLISE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (AMR)	47

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Dados clínicos.....	50
4.1.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	50
4.2	Caracterização da microbiota por sequenciamento de DNA total	58
4.2.1	CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA	62
4.2.2	DIVERSIDADE MICROBIANA ALFA E BETA.....	63
4.2.3	COMPOSIÇÃO BACTERIANA ENTRE CASOS E CONTROLES	72
4.2.4	ANÁLISE DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (AMR)	94
5	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS.....	134
	Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	134
	APÊNDICES.....	142
	Apêndice A – Métodos e resultados referentes as coletas de líquido peritoneal e tecidos ..	142
	Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e esclarecido	150
	Apêndice C – Instrumento de coleta de dados.....	156

1 INTRODUÇÃO

1.2 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, ocupando a primeira posição em 18 dos 185 países e estando entre o segundo ou terceiro mais prevalente em outros 78 países (Morgan *et al.* 2023). A mortalidade associada a essa doença ultrapassa 930.000 óbitos anuais, colocando-a como a segunda principal causa de morte entre as neoplasias malignas (WHO 2025). Sua distribuição geográfica está intimamente relacionada a características étnicas, socioeconômicas e aos fatores de risco para o desenvolvimento desta doença (IARC 2025b; Sninsky *et al.* 2022; Siegel *et al.* 2020), o que reflete na sua incidência global, conforme *Global Cancer Observatory* (IARC 2025a).

Estudos recentes têm demonstrado que a incidência de CCR, principalmente em indivíduos acima dos 50 anos de idade, em países com alto índice de desenvolvimento humano (IDH), tem se mantido estável ou diminuído. Esse padrão pode ser atribuído ao melhor manejo dos fatores de risco modificáveis (associado a mais de 50% dos casos) e ao rastreamento de lesões pré-cancerosas (ACS 2025; Siegel *et al.* 2020). No entanto, hoje se observa um aumento no número de casos entre jovens adultos (abaixo de 50 anos), e embora haja elevado interesse científico e diversas publicações sobre o assunto, as causas desse aumento permanecem incertas. A implementação de programas de rastreamento e a realização de campanhas que incentivam a busca de diagnósticos mais precoce podem ajudar a modificar este cenário, mas fazem necessários estudos que esclareçam as causas e identifiquem as melhores estratégias de prevenção (ACS 2025; Araghi *et al.* 2019; Vuik *et al.* 2019; Ionescu *et al.* 2023).

Por outro lado, taxas crescentes em fatores de risco modificáveis, como a obesidade e o sobrepeso, em países desenvolvidos como os EUA, Austrália e Reino Unido podem alterar este quadro atual (Sung *et al.* 2019; Vuik *et al.* 2019), assim como nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento que continuam apresentando um crescimento acelerado nas taxas de incidência e mortalidade (Arnold *et al.* 2017; Arnold *et al.* 2020).

Contudo, a *Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer* (IARC), estima que até 2040, haverá um aumento de 63% na incidência anual de novos casos, especialmente em populações com alto IDH (aproximadamente 80%), acompanhado por um crescimento de 73%

na taxa de mortalidade, o que resultará em cerca de 1,6 milhão de óbitos por CCR (IARC 2025a).

O termo CCR refere-se a neoplasias malignas que se desenvolvem no intestino grosso, abrangendo o cólon, reto e ânus (Bray *et al.* 2018). Essas neoplasias são usualmente classificadas em três subgrupos: proximal ou direito, distal ou esquerdo e reto (Frattini *et al.* 2004; Gao *et al.* 2017), no entanto, alguns estudos podem incluir reto no subgrupo distal (ACS 2025). A divisão entre direito e esquerdo é feita na flexura esplênica do cólon, onde o subgrupo proximal ou direito é composto pelo cólon ascendente, o ceco e o cólon transversal e o subgrupo distal ou esquerdo, inclui o cólon descendente e o sigmoide (ACS 2025; Frattini *et al.* 2004; Gao *et al.* 2017). Já os cânceres retais contemplam lesões localizadas até 12cm da borda anal (Gao *et al.* 2017).

A incidência do CCR nestes subgrupos pode variar de acordo com a localização geográfica e hábitos de vida de cada indivíduo, sendo que algumas publicações sugerem que os fatores de risco também possam ser diferentes (Cheng *et al.* 2011; Hansen e Jess 2012; Qu *et al.* 2021; Thanikachalam e Khan 2019). Estudos indicam uma maior prevalência de casos de câncer colorretal com origem no reto, correspondendo a mais de 40% dos casos, enquanto as porções distal e proximal apresentam incidência em torno de 20% (Qu *et al.* 2021; Thanikachalam e Khan 2019).

Os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de CCR foram amplamente estudados nas últimas décadas, evidenciando que acima de 55% dos casos estão associados a fatores de risco modificáveis, ou seja, relacionados ao estilo de vida e hábitos alimentares, como: inatividade física, consumo de álcool e tabaco, obesidade, dieta com baixa ingestão de fibras e alto consumo de alimentos processados, entre outros (ACS 2025, Siegel *et al.* 2020). Contudo, os fatores de risco não modificáveis como idade avançada (acima dos 50 anos), sexo, histórico familiar e características genéticas (Frank *et al.* 2017; INCA 2024; Sninsky *et al.* 2022) também têm grande influência na gênese da doença. Indivíduos com histórico familiar de primeiro grau apresentam de 2 a 4 vezes mais chance de desenvolvimento da doença quando comparados a indivíduos sem este histórico (ACS 2025).

Cerca de 96% dos casos de CCR tem como precursores os pólipos adenomatosos (adenomas), que podem se diferenciar gradualmente em lesões malignas que ao longo de seu desenvolvimento se tornam invasivos e posteriormente metastáticos. A transição adenoma-

adenocarcinoma é diretamente proporcional ao tamanho do pólipó e acredita-se que aproximadamente 10% dos pólipos passam por esta diferenciação (Stewart *et al.* 2006). A detecção e remoção de pólipos benignos (adenomas) durante exames de rastreio, como a colonoscopia, é a principal estratégia para prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal. Quando o câncer é efetivamente diagnosticado em sua fase inicial (doença localizada), a taxa de sobrevida relativa em 5 anos é de aproximadamente 91%. No entanto, se o diagnóstico ocorre apenas após a doença ter invadido tecidos adjacentes e desenvolvido metástases à distância, essa taxa cai para cerca de 16%, destacando a importância crucial do diagnóstico precoce (National Cancer Institute, 2025). Para a maioria dos casos de câncer colorretal localizado, o tratamento cirúrgico é a modalidade primária com intenção curativa (Lauka *et al.* 2019).

1.3 Fístulas anastomóticas (FAs)

As fístulas anastomóticas representam uma das complicações pós-operatórias mais graves e frequentes nas cirurgias colorretais (Chiarello *et al.* 2022). Esse desfecho geralmente ocorre nas primeiras duas semanas após o procedimento cirúrgico (Hyman *et al.* 2007; Morks *et al.* 2013) e pode estar associado a processos inflamatórios, infecciosos, neoplásicos ou traumáticos. A incidência dessa complicação em pacientes submetidos à cirurgia colorretal varia consideravelmente na literatura, oscilando entre 1,5% e 28% (Artus *et al.* 2020; Bakker *et al.* 2014; Kornmann *et al.* 2012; McDermott *et al.* 2015; Vallance *et al.* 2017; Van Rooijen *et al.* 2016; Zarnescu *et al.* 2021).

A compreensão dos fatores que influenciam o desenvolvimento de FA tem sido objeto de investigação contínua nas últimas décadas, refletida no crescimento expressivo do número de publicações sobre o tema na base PubMed, que passou de 150 artigos em 2010 para 945 em 2024. No entanto, a literatura apresenta alta heterogeneidade metodológica, resultando em dados conflitantes que dificultam a identificação consistente dos fatores de risco possivelmente associados a esse desfecho cirúrgico. A própria terminologia utilizada nos estudos carece de uniformidade, sendo comum a variação entre os termos deiscência anastomótica, vazamento anastomótico, ou fístula anastomótica pós-operatória. Características como o grau de extravasamento, conduta clínica, necessidade de reoperação,

entre outros fatores clínicos e cirúrgicos, também impactam o delineamento dos estudos e protocolos sugeridos para este desfecho (Foppa *et al.* 2020; Paliogiannis *et al.* 2020; Sripathi *et al.* 2022; Tsalikidis *et al.* 2023; Zarnescu *et al.* 2021). Importante destacar que apenas em 2020 um grupo internacional de especialistas composto por cirurgiões colorretais e pesquisadores recomendou que o uso da definição proposta pela *International Study Group of Rectal Cancer* (ISREC) fosse adotada como o padrão de referência para a caracterização de FA (van Helsdingen *et al.* 2020).

1.3.1 FATORES DE RISCO

A identificação de biomarcadores, técnicas cirúrgicas, biomateriais e uso de medicamentos tem sido alvo de estudos para reduzir o risco de FA após cirurgia (Reischl *et al.* 2021), mas ainda não há evidências conclusivas na literatura que estabeleçam uma causa raiz para esse desfecho (Alverdy e Schardey 2021). Diversos estudos apontam fatores relacionados ao paciente, ao procedimento cirúrgico e ao próprio cirurgião como determinantes na ocorrência de FA (Alverdy e Schardey 2021; Zarnescu *et al.* 2021).

Diante da multiplicidade de fatores identificados na literatura, optou-se por destacar nesta revisão bibliográfica os principais preditores identificados com maior frequência e que apresentam potencial influência sobre a microbiota intestinal dos pacientes (**Tabela 1**).

Tabela 1: Principais fatores de risco associado ao desenvolvimento de FA.

Fator de risco	
Estabelecidos	Inconclusivos
Sexo masculino	Idade
Álcool	Técnica cirúrgica
Tabagismo	Quimiorradioterapia
Obesidade	Preparação mecânica do intestino
Estado nutricional	
Diabetes mellitus	
Sarcopenia radiológica	
Doença cardiovascular	
Doença pulmonar	
Falência renal	
Classificação ASA	
Imunossupressores	
Bevacizumabe	
AIEs	

O sexo masculino tem sido amplamente apontado como um fator de risco para FA em diversos estudos (Alekseev *et al.* 2022; Arron *et al.* 2021; Hamabe *et al.* 2018; Krarup *et al.* 2012; Park *et al.* 2013). Essa associação tem sido atribuída a aspectos anatômicos, como a pelve mais estreita (Law *et al.* 2000; Prabhakaran *et al.* 2022; Yu *et al.* 2021) e a maior quantidade de gordura visceral (Verduin *et al.* 2021). A influência de hormônios andrógenos na microcirculação intestinal ainda vem sendo estudada como possível fator agravante no surgimento de FA (Ba *et al.* 2004; Rutegård *et al.* 2024).

A influência da idade, por sua vez, permanece controversa. Embora alguns estudos tenham identificado a idade avançada como um fator associado ao aumento da incidência de fístulas anastomóticas (Boström *et al.* 2019; Jung *et al.* 2008; Krarup *et al.* 2012; Lin *et al.* 2011), muitos estudos têm refutado esta ideia, não encontrando esta associação (Bakker *et al.* 2014; Buchs *et al.* 2008; Jannasch *et al.* 2015; Konishi *et al.* 2006; Lipska *et al.* 2006; Pommergaard *et al.* 2014; Telem *et al.* 2010; Tsalikidis *et al.* 2023).

Fatores de risco relacionados ao estilo de vida, como consumo excessivo de álcool e tabagismo têm demonstrado capacidade de interferir na cicatrização e consequentemente no comprometimento da integridade da anastomose cirúrgica (Jannasch *et al.* 2015; Sorensen *et al.* 2005; Kwak *et al.* 2017).

A classificação da *American Society of Anesthesiologists* (ASA) é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar o quadro geral de saúde do paciente no período pré-operatório, permitindo a estratificação do risco cirúrgico com base em uma escala que varia de I a VI, onde I: sem doenças sistêmicas; II: com doença sistêmica leve e controlada; III: com doença sistêmica grave, mas não incapacitante; IV: doença sistêmica grave incapacitante; V: moribundos, com expectativa de vida inferior a 24 horas; VI: é morte cerebral, mantidos apenas para fins de doação de órgãos (Doyle *et al.* 2022). Pacientes com classificação ASA $\geq$ III tiveram maior frequência de FA (Bakker *et al.* 2014; Buchs *et al.* 2008; Choi *et al.* 2006) e um estudo realizado por Buchs *et al.* (2008) observou que o risco de desenvolvimento de fístula aumentava 2,5 vezes a cada incremento na escala ASA. Considerando que o escore ASA é determinado com base na presença e gravidade de comorbidades, é importante ressaltar que condições como diabetes mellitus (Cong *et al.* 2009; Penna *et al.* 2019; Rencuzogullari *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017), sarcopenia radiológica (Chirivella-Fernandez *et al.* 2025), doença cardiovascular (Akgun *et al.* 2018), doença pulmonar (Rencuzogullari *et al.* 2017; Slieker *et al.*

2012), falência renal (Alves *et al.* 2002; Krysa *et al.* 2008), uso de imunossupressores (Krysa *et al.* 2008; Van der Vliet *et al.* 2006) e tratamento com Bevacizumabe - um anticorpo monoclonal anti-VEGF-A usado em certos tratamentos oncológicos (August, Serrano e Poplin 2008; Lemmens, Claes e Uzzell 2008; Machida *et al.* 2019; Roche 2021), já foram associados a aumento na incidência de fístulas.

Fatores relacionados ao estado nutricional e obesidade demonstram correlação significativa com a ocorrência de FAs. A obesidade, definida por um índice de IMC superior a 30kg/m², tem sido identificada como fator de risco independente, principalmente em casos de anastomose baixa (Akiyoshi *et al.* 2011; Biondo *et al.* 2005; Frasson *et al.* 2016; Nikolian *et al.* 2017; Nugent *et al.* 2021). Entretanto, estudos que avaliam a gordura visceral por meio de tomografia computadorizada, sugerem que esta pode ser uma métrica mais assertiva para avaliar o risco de FA (Cakir *et al.* 2015; Verduin *et al.* 2021; Yang *et al.* 2015; Yu *et al.* 2021; Watanabe *et al.* 2014).

Além disso, distúrbios hidroeletrólíticos, perda de peso acentuada e desnutrição foram associados de forma expressiva ao desenvolvimento de FA (Kang *et al.* 2013; Kwag *et al.* 2014; Mäkelä, Kiviniemi e Laitinen 2003), assim como os níveis de albumina (<3,5 g/dL) (Lago *et al.* 2019; Telem *et al.* 2010; Yu *et al.* 2020). O risco nutricional está intimamente ligado a processos de cicatrização, contribuindo não apenas para o aumento da incidência de fístulas, mas também para a elevação das taxas de complicações pós-operatórias em geral (Chirivella-Fernandez *et al.* 2025; Kang *et al.* 2013; Mäkelä, Kiviniemi e Laitinen 2003).

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são amplamente utilizados no dia a dia, sendo seu uso no pós-operatório uma prática comum, voltada ao controle da dor e à redução da necessidade de uso de opioides. Evidências na literatura sugerem uma possível associação entre o uso de AIEs e o aumento da incidência de FAs (Gorissen *et al.* 2012; Holte *et al.* 2009; Huang, Tang e Young 2018; Klein *et al.* 2012; Konish *et al.* 2006; Midura *et al.* 2015; Slieker *et al.* 2012). Um estudo conduzido por Slieker *et al.* (2012), avaliou os efeitos do uso crônico e do uso exclusivo de AIEs no pós-operatório, onde observaram que 50% dos pacientes com uso prolongado desenvolveram FA, contra 19% nos pacientes que utilizaram estas medicações apenas no período pós-operatório. Em uma tentativa de reduzir possíveis erros e variáveis, Konishi e colaboradores (2006), conduziram um estudo prospectivo com controle rigoroso das variáveis operatórias, onde todos os pacientes foram submetidos ao procedimento cirúrgico

pelo mesmo cirurgião, no mesmo hospital, e os dados prospectivos coletados pelo mesmo membro da equipe, demonstrando que o uso de AIEs elevou a ocorrência de fístulas de 2,4% para 11,8%. Contudo, não foi possível determinar a dosagem e duração do tratamento responsável por este desenrolar clínico.

As técnicas cirúrgicas vêm evoluindo ao longo dos anos, tornando os procedimentos cirúrgicos menos invasivos, com abordagens como laparoscopia ou cirurgia robótica sendo amplamente utilizadas na prática clínica (Foppa *et al.* 2020; Vallance *et al.* 2017; Zarnescu *et al.* 2021). O papel dessas abordagens cirúrgicas no desenvolvimento de FAs foi avaliado e resultou em dados conflitantes (Fleshman *et al.* 2015; Stevenson *et al.* 2015; Vasiliu *et al.* 2015) que não permitem afirmar que exista uma correlação significativa entre essas técnicas e o aumento na ocorrência de FA (Chen *et al.* 2017; Fleshman *et al.* 2015; Foppa *et al.* 2020; Jayne *et al.* 2010; Kang *et al.* 2010; Ng *et al.* 2013; Van der Pas *et al.* 2013; Vasiliu *et al.* 2015; Vennix *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2018).

Uma meta-análise demonstrou que a ressecção retal laparoscópica - associada a menor perda de sangue, incisões menores e maior tempo operatório em comparação com a abordagem aberta - não interferiu diretamente na morbidade e mortalidade pós-operatórias ou no surgimento fístulas (Martínez-Pérez *et al.* 2017). Da mesma forma, ao comparar as abordagens laparoscópica e robótica, não foram identificadas diferenças significativas entre ambas (Al-Mazrou *et al.* 2017; Ahmed *et al.* 2017). Adicionalmente, uma meta-análise mais recente evidenciou que técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, em comparação com a cirurgia aberta em casos de câncer retal, proporcionaram menor tempo de internação, redução de perda sanguínea e retomada alimentar precoce, melhorando significativamente os desfechos de curto prazo nestes pacientes (Hsu *et al.* 2025).

O tratamento neoadjuvante com quimiorradioterapia, assim como diversos outros fatores de risco para FA, também apresenta conflitantes na literatura. Vários estudos relatam uma associação significativa entre esse tipo de tratamento e o aumento na incidência de FA, possivelmente devido ao comprometimento da cicatrização intestinal e aumento da fibrose ao danificar o sistema vascular local e prejudicar a função dos fibroblastos (Hamabe *et al.* 2018; Park *et al.* 2013; Pommergaard *et al.* 2014; Qin *et al.* 2016). Por outro lado, outros autores não identificaram tal correlação, sugerindo que a quimiorradioterapia neoadjuvante não estaria

associada ao aumento do risco de FA (Chang *et al.* 2014; Hu *et al.* 2017; Ma *et al.* 2017; Qin *et al.* 2014; Yang *et al.* 2022).

A preparação mecânica do intestino (PIM) consiste na administração pré-operatória de substâncias para induzir a evacuação do conteúdo intestinal e colônico, com intuito de reduzir o risco de infecções do sítio cirúrgico e outras complicações através da diminuição da massa fecal intraluminal (Chaouch *et al.* 2020; OMS 2018). Essa prática vem sendo empregada há décadas, embora existam dados conflitantes quanto à sua eficácia e evidências crescentes que questionam seus benefícios (Battersby *et al.* 2019; Liu *et al.* 2018). Diversos estudos indicam que a descontaminação intestinal promovida pela PIM não apresenta efeito significativo na redução da incidência de fístulas anastomóticas (Chaouch *et al.* 2020; Güenaga *et al.* 2011; Slim *et al.* 2009; van't Sant *et al.* 2010; Zmora *et al.* 2006). Uma meta-análise conduzida por Rollins e colaboradores (2019), envolvendo 40 estudos, reforçou esses achados ao não identificar associação entre o uso isolado da PIM e a diminuição de complicações pós-operatórias. Por outro lado, quando combinada à profilaxia antibiótica, a PIM demonstrou impacto positivo na redução de uma ou mais das seguintes variáveis: fístulas anastomóticas, complicações pós-operatórias e infecções intra-abdominais (Futier *et al.* 2022; Kiran *et al.* 2015; Lee *et al.* 2021; Moghadamyeghaneh *et al.* 2015; Morris *et al.* 2015; Scarborough *et al.* 2015). Essa correlação foi confirmada por outras meta-análises (Hansen *et al.* 2023; Maatouk *et al.* 2023; Rollins *et al.* 2019; Toh *et al.* 2018). Contudo, o estudo multicêntrico MOBILE, conduzido por Koskenvuo *et al.* (2021) em pacientes submetidos à colectomia direita e esquerda, demonstrou que a associação entre PIM e antibióticos profiláticos não resultou em redução da ocorrência de fístulas anastomóticas, alinhado com achados mais recentes (Frountzas *et al.* 2024).

Entretanto, ao analisarem 40.446 pacientes, Garfinkle e colaboradores (2017) observaram que a combinação de PIM com antibióticos profiláticos não foi superior à profilaxia antibiótica isolada quanto aos desfechos pós cirúrgicos. Em outra investigação de coorte, abrangendo mais de 30 mil pacientes, Lu *et al.* (2025b) avaliaram o impacto do uso de antibióticos em longo prazo (até 4,5 anos antes da cirurgia) e identificaram uma associação significativa com o risco de infecções do sítio cirúrgico em pacientes com câncer de cólon, demonstrando uma relação dose-resposta consistente para diversas classes de antimicrobianos. Desta forma, é relevante ressaltar que a administração de antibióticos têm sido associada à redução da diversidade microbiana e ao aumento da resistência

antimicrobiana, com evidências de que adaptações funcionais da microbiota podem favorecer fenótipos multirresistentes e alterar o metabolismo de fármacos (Lange *et al.* 2016; Carlet 2012; Guffey e Loll 2021; Lamaudiere *et al.* 2023; Liu *et al.* 2011a).

Embora diversos estudos tenham explorado a diversidade microbiana sob diferentes perspectivas, a perda da diversidade microbiana e sua influência ainda não foi completamente elucidada, estabelecendo com clareza quais microrganismos teriam potencial patogênico e quais poderiam ser benéficos (Lauka *et al.* 2019).

1.4 Impacto de fístulas anastomóticas (FAs): aspectos financeiros, tempo de internação, complicações no tratamento e sobrevida

As fístulas anastomóticas estão frequentemente associadas a maior tempo de internação, aumento nas taxas de reoperações, necessidade de estoma de derivação, além da elevação da mortalidade e morbidade (Weber *et al.* 2023; Arron *et al.* 2021). A gravidade clínica deste desfecho frequentemente exige a realização de múltiplos procedimentos para o controle desta condição aguda, incluindo em muitos casos a necessidade de reintervenções cirúrgicas (Flor-Lorente *et al.* 2023; Hedrick *et al.* 2021). Essa situação pode comprometer significativamente a continuidade do tratamento oncológico, como o adiamento das sessões de quimioterapia adjuvante, em razão da necessidade de estabilização clínica e recuperação do paciente frente às complicações decorrentes da fístula (Enodien *et al.* 2022; van't Sant *et al.* 2011). Em casos assintomáticos ou com poucos sintomas clínicos, o manejo conservador pode ser uma alternativa viável, por meio de drenagem percutânea ou abordagem endoscópica (Flor-Lorente *et al.* 2023; Hedrick *et al.* 2021). No entanto, independente da gravidade, há comprometimento da qualidade de vida dos pacientes e aumento significativo nos custos dos sistemas de saúde (Flor-Lorente *et al.* 2023; Weber *et al.* 2023).

Um estudo recente buscou identificar quais fatores críticos no manejo de pacientes que desenvolvem fístulas são responsáveis pelo aumento dos custos hospitalares. A variável considerada mais impactante foi o tempo de internação em unidade de terapia intensiva (UTI), que apresentou incremento superior a três vezes nos pacientes com fístula, enquanto indivíduos submetidos à cirurgia colorretal sem complicações permaneceram, em média 2,1 dias na UTI, aqueles que desenvolveram fístulas anastomóticas necessitaram de 7,83 dias de

internação intensiva (Enodien *et al.* 2022). Esses achados estão em consonância com os dados apresentados por La Regina *et al.* (2019), que demonstraram que os custos médios associados a pacientes com complicações foram aproximadamente quatro vezes maiores em comparação a aqueles sem intercorrências. Nos casos sem fístula, o lucro hospitalar médio foi estimado em 542 euros por paciente, enquanto nos casos com fístula houve um prejuízo médio de 12.181 euros por paciente.

A complexidade clínica da fístula anastomótica está diretamente relacionada ao aumento dos custos no tratamento desses pacientes, uma vez que sua ocorrência pode desencadear complicações adicionais gerando custos ainda mais elevados. Estima-se que metade, ou até mais, dos pacientes com FA irão precisar de reintervenções cirúrgicas, enquanto a outra parte exigirá tratamento clínico ou radiológico adicional. De acordo com Flor-Lorente *et al.* (2023), esses valores podem variar de 6 mil a 44 mil euros por paciente, dependendo da gravidade da FA.

A complicação secundária mais comum nesses casos é a sepse, responsável por cerca de 25% dos óbitos entre os pacientes que apresentam FA (Fried *et al.* 2011; Mulita *et al.* 2022). Estima-se ainda que pelo menos um terço dos episódios de sepse em pacientes com câncer colorretal esteja diretamente associado à ocorrência de FA (Kube *et al.* 2010; Mulita *et al.* 2022).

Este desfecho clínico sobrecarrega os sistemas de saúde, assim como afeta de maneira significativa a qualidade de vida dos pacientes, especialmente porque os estomas realizados nesse contexto muitas vezes tornam-se permanentes (Enodien *et al.* 2022; Flor-Lorente *et al.* 2023; Kang *et al.* 2022). Contudo, a mortalidade associada à FA pode ser elevada de 7% a 39%, dependendo da gravidade do quadro e da instituição envolvida (Frasson *et al.* 2016; Kornmann *et al.* 2012; Vallance *et al.* 2017; Van Rooijen *et al.* 2016; Van't Sant *et al.* 2010; Zarnescu *et al.* 2021).

Uma revisão sistemática realizada por Nijssen *et al.* (2024) evidenciou grande heterogeneidade metodológica nos estudos sobre os custos de FA após cirurgia colorretal, com variações no horizonte temporal analisado, nas abordagens de cálculo e nos valores estimados, que oscilaram de 2.250 euros (Romênia) a 83.633 euros (Brasil) por paciente, com diferença de até 500%. Em diversos estudos, a presença de FA duplicou ou até quintuplicou os custos hospitalares, sendo a internação em UTI e as reintervenções os principais

determinantes desses gastos. A maioria das análises se restringiu a períodos curtos (até 30 dias), desconsiderando eventos tardios relevantes, como estomas permanentes e sepse crônica.

Entretanto, os custos sociais e indiretos, como perda de produtividade e impacto na qualidade de vida e sobrevida foram pouco abordados, limitando a compreensão da real carga socioeconômica dessa complicação.

1.5 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal é considerada a mais rica e diversificada do corpo humano (Human Microbiome Project 2012), com aproximadamente 1,3x mais células microbianas do que células humanas somáticas e germinativas combinadas (Sender, Fuchs e Milo 2016). Essa comunidade é composta por bactérias, fungos, arqueias, vírus, protozoários e parasitas diversos, que refletem sua complexidade e diversidade funcional (Jandhyala *et al.* 2015; Ramakrishna 2007; Shi *et al.* 2017). Em indivíduos saudáveis, a microbiota intestinal desempenha funções metabólicas, imunológicas e protetoras essenciais, sendo indispensável para a manutenção da saúde por meio de uma relação simbiótica com o hospedeiro (Jandhyala *et al.* 2015; Russo *et al.* 2016; Vemuri *et al.* 2017). Embora a microbiota intestinal envolva diferentes grupos de microrganismos, neste trabalho o foco será direcionado às bactérias, que representam a parcela mais estudada e, aparentemente, de maior relevância clínica.

Quando essa relação simbiótica é rompida por alterações quantitativas ou qualitativas da microbiota intestinal, se estabelece um quadro de disbiose (Kaźmierczak-Siedlecka *et al.* 2020; Shi *et al.* 2017), onde o desequilíbrio pode favorecer microrganismos com potencial patogênico. Para que haja a instalação de um processo infeccioso, a adesão ou penetração do microrganismo nos tecidos do hospedeiro não é obrigatória, o acúmulo de excretas microbianas pode ser suficiente para desencadear alterações no funcionamento fisiológico do organismo. A patogenicidade refere-se à capacidade do microrganismo em causar doenças, enquanto a virulência expressa o grau dessa patogenicidade (Tortora, Funke e Case 2017).

A análise da diversidade bacteriana por métodos clássicos de cultivo e caracterização *in vitro*, foi historicamente limitada pela dificuldade de cultivar bactérias *ex vivo*, especialmente bactérias anaeróbias obrigatórias, predominantes no intestino grosso. O intestino humano

abriga um grande número de diferentes gêneros, espécies e cepas bacterianas (Qin *et al.* 2010; Segata *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2014). Estudo recente sugere cerca de 3 mil diferentes espécies divididas em cerca de 130 gêneros (Rosenberg 2024), sendo a maior parte não cultivável (Qin *et al.* 2010; Segata *et al.* 2012; Thomas e Segata 2019; Zhou *et al.* 2014). No entanto, os avanços tecnológicos em desenvolvimento de métodos moleculares, possibilitam uma identificação mais abrangente e precisa das bactérias presentes na microbiota de diversos ambientes, sem necessidade de seu cultivo (Ramakrishna 2007, Thomas e Segata 2019).

A microbiota intestinal saudável abriga uma ampla variedade de filos bacterianos, porém quatro são predominantes: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Russo *et al.* 2016; Segata *et al.* 2012). Dentre esses, estima-se que aproximadamente 80% das bactérias intestinais pertençam aos filos gram-negativo *Bacteroidetes* e gram-positivos *Firmicutes* (Bartolini *et al.* 2020; Guyton e Alverdy 2017; Segata *et al.* 2012). No filo *Bacteroidetes* os gêneros mais abundantes são *Bacteroides* e *Prevotella*, sendo que em média apenas 20% são representados por gêneros menos abundantes, que ainda assim desempenham funções fundamentais no intestino humano (Arumugam *et al.* 2011; Koren *et al.* 2013).

A composição da microbiota intestinal é altamente dinâmica, apresentando variações em termos de espécies, cepas, distribuição, diversidade e abundância bacteriana. Acredita-se que a modulação dessas populações seja feita por diversos fatores, incluindo idade, genética do hospedeiro, meio ambiente, dieta, uso de medicamentos e procedimentos médicos, entre outros (Brown *et al.* 2013; Clemente *et al.* 2012; Guan e Liu 2023; Ramakrishna 2007; Russo *et al.* 2016; Shi *et al.* 2017; Yatsunencko *et al.* 2012). Essa composição ao longo do trato gastrointestinal ainda não está completamente elucidada, no entanto, o pH gástrico exerce um papel importante ao limitar a sobrevivência de diversos microrganismos, restringindo seu trânsito ao longo do sistema digestivo. Esse mecanismo contribui para a diferenciação da microbiota entre as porções superiores e inferiores do trato gastrointestinal (Ramakrishna 2007; Russo *et al.* 2016). Além disso, a composição basal também pode variar conforme a localização anatômica nos intestinos, refletindo adaptações regionais às condições fisiológicas locais (Alrushaid *et al.* 2023; Gao *et al.* 2017; Hajjar *et al.* 2023; Zhong *et al.* 2020). Outro fator importante é a motilidade intestinal, especialmente no intestino delgado, onde o trânsito acelerado favorece a eliminação das bactérias presentes no lúmen, enquanto aquelas aderidas à mucosa tendem a ser menos afetadas pelo peristaltismo (Ramakrishna 2007; Russo *et al.*

2016). Contudo, a dieta vem sendo considerada o principal determinante da composição dessa microbiota, uma vez que está se encontra continuamente exposta às alterações na disponibilidade, qualidade e tipo de nutrientes ingeridos (Brown *et al.* 2013; Clemente *et al.* 2012; Guan e Liu 2023; Ramakrishna 2007; Russo *et al.* 2016; Shi *et al.* 2017; Yatsunenko *et al.* 2012).

Intervenções dietéticas pré-operatórias, como o consumo de uma dieta pobre em gordura e rica em fibras, demonstraram potencial para melhorar a cicatrização anastomótica possivelmente por meio da modulação do microbioma, e mesmo a adoção temporária de uma dieta mais saudável antes da cirurgia pode restaurar a diversidade microbiana e melhorar prognósticos cirúrgicos (Guo *et al.* 2024; Hyoju *et al.* 2020).

Estudos de forma geral buscam compreender as associações entre estilo de vida, saúde e microbiota, com foco na variabilidade global da composição microbiana. Arumugam e colaboradores (2011) propuseram uma abordagem diferente, levando em consideração diferenças entre perfis microbiológicos, propondo agrupamentos (clusters) de composição microbiana, caracterizados pela predominância dos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus*. Estes clusters apresentam diferenças na composição filogenética, nas vias funcionais e nos perfis metabólicos, especialmente relacionados à fermentação de substratos e produção de vitaminas.

Um estudo mais recente, conduzido por Manor *et al.* (2020) mantém a proposta de agrupamentos de composição microbiana, correlacionando esses perfis microbianos a respostas dietéticas, propondo por exemplo, que indivíduos com microbiotas dominados por *Bacteroides* poderiam obter maior benefício ao reduzir o consumo de doces e massas, comportamento associado ao aumento de *Christensenellaceae*, uma família bacteriana relacionada à magreza. De modo semelhante, o consumo de vegetais promoveria o aumento da diversidade microbiana apenas no cluster dominado por *Prevotella*. O estudo conclui que estratégias nutricionais personalizadas podem ser mais eficazes quando ajustadas ao perfil microbiano individual, uma vez que este está profundamente associado a múltiplos aspectos da saúde humana, estilo de vida e dieta, indo além de correlações isoladas com táxons específicos (Manor *et al.* 2020).

Bactérias podem produzir energia a partir de diferentes estratégias metabólicas, podendo realizar respiração aeróbica ou anaeróbica e fermentação. As bactérias aeróbicas necessitam de oxigênio para seu crescimento, pois utilizam esse elemento comoceptor final

de elétrons em sua cadeia respiratória, enquanto as bactérias anaeróbias não conseguem crescer na presença de oxigênio, uma vez que este pode ser tóxico. Já as bactérias anaeróbias facultativas apresentam maior flexibilidade, sendo capazes de se desenvolver tanto em ambientes com oxigênio quanto em condições anaeróbicas, adaptando seu metabolismo conforme a disponibilidade de oxigênio (Tortora, Funke e Case 2017).

O intestino grosso é considerado um ambiente anaeróbio, onde bactérias aeróbias patogênicas não conseguem invadir e colonizar facilmente (Bäckhed *et al.* 2012; Manichanh *et al.* 2006). A presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), no intestino, pode favorecer o crescimento de bactérias aeróbias e facultativas, intensificando a competição por oxigênio. A produção de ROS por tecidos inflamados passou a ser reinterpretado nas últimas décadas, deixando de ser agentes tóxicos causadores de inflamação, para reguladores críticos destes processos. Essa demanda exacerbada em um tecido já comprometido por lesões vasculares, contribui para um desequilíbrio no suprimento de oxigênio e pode resultar em um estado de hipóxia local (Bedard *et al.* 2007; Sen e Roy 2008).

Atualmente, reconhece-se que a microbiota intestinal desempenha funções amplas e complexas no organismo humano, incluindo a regulação da angiogênese, a metabolização de agentes quimioterápicos e a manutenção da integridade da barreira mucosa (Reinhardt 2018; Shi *et al.* 2017). Além disso, essa microbiota é capaz de desregular o sistema imune, assim como uma desregulação intestinal do sistema imune também pode desencadear uma disbiose (Brown *et al.* 2013; Clemente *et al.* 2012; Hajjar *et al.* 2023)

A modulação do sistema imunológico inato e adaptativo pela microbiota ocorre por meio da interação com células dendríticas e da estimulação de receptores epiteliais (Bartolini *et al.* 2020). A parede intestinal é recoberta por células epiteliais mucosas que ao serem ativadas por estímulos nervosos ou mecânicos, secretam um muco protetor. Esse muco atua como uma barreira física, protegendo o intestino grosso contra lesões provocadas pela intensa atividade bacteriana e por eventuais escoriações causadas pelos ácidos presentes nas fezes (Guyton e Alverdy 2017). Além disso, as células epiteliais desempenham um papel ativo na resposta imune ao secretarem citocinas e quimiocinas que desencadeiam cascatas de sinalização, promovendo a maturação e diferenciação de células imunocompetentes (Shi *et al.* 2017). Vale destacar que o sistema imunológico inato das mucosas representa o maior componente imunológico em vertebrados, respondendo por aproximadamente 80% de toda a atividade imune do organismo (Bartolini *et al.* 2020).

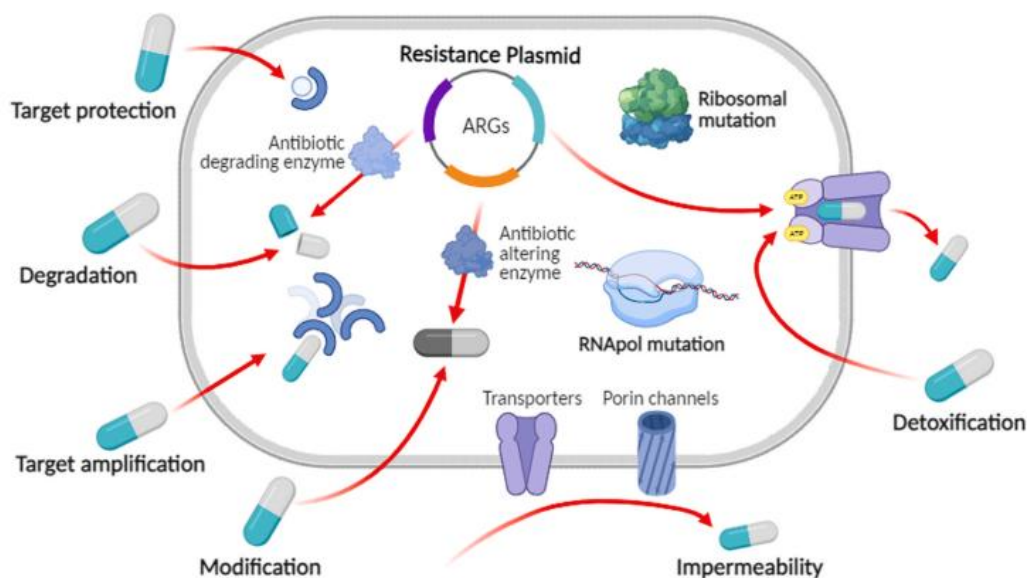
A presença de *Bacteroides thetaiotaomicron* tem sido associada à modulação da angiogênese intestinal por meio de sua interação com células de Paneth. Essas células, além de exercerem função imunológica, secretam proteínas antimicrobianas como a angiogenina-4, favorecendo a integridade da barreira mucosa e criando um ambiente propício ao desenvolvimento vascular, auxiliando no processo de cicatrização (Hooper *et al.* 2003; Stappenbeck *et al.* 2002).

As atividades metabólicas desempenhadas pela microbiota intestinal exercem impacto fisiológico significativo na manutenção da integridade da mucosa intestinal, em especial por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), que têm importante capacidade de modulação da microbiota, ácidos biliares secundários e as bacteriocinas (Ducarmon *et al.* 2019; Litvak, Byndloss e Bäumler 2018; Louis *et al.* 2017; Ríos-Covián *et al.* 2016). A produção de SCFAs ocorre principalmente pela fermentação de carboidratos não digestíveis, resultando nos três principais metabólitos: acetato, propionato e butirato. Os dois primeiros, quando em altas concentrações de sua forma lipofílica podem atravessar a membrana celular das bactérias, levando a liberação de prótons, com queda de pH (levando à morte celular ou redução de taxa de multiplicação). Já o butirato exerce efeitos diretos sobre o epitélio intestinal, promovendo a produção de muco e a formação *tight junctions*, ambos mecanismos fortalecem a barreira intestinal, além de modular absorção de sódio e cloreto, promover a proliferação e diferenciação de células epiteliais, e induzir reparo tecidual (Louis *et al.* 2017; Guan e Liu 2023; Ramakrishna 2007; O'Hara e Shanahan 2006).

A redução da diversidade da microbiota intestinal e o aumento da resistência antimicrobiana estão consistentemente associados à administração de antibióticos (Lange *et al.* 2016). Genes de resistência antimicrobianos localizam-se nos cromossomos bacterianos, e em elementos móveis, como plasmídeos e transposons (Aminov *et al.* 2001), facilitando a transferência de informações entre as bactérias independentemente da espécie (Tortora *et al.* 2017; Ochman, Lawrence e Groisman 2000). Esses genes conferem às bactérias um amplo repertório de mecanismos de defesa contra os agentes antimicrobianos (**Figura 1**), incluindo a degradação ou modificação da molécula do antibiótico, a proteção ou mutação do alvo de ação, a redução da permeabilidade da membrana e a ativação de bombas de efluxo. Além disso, podem estar envolvidos processos que permitem às bactérias manterem sua atividade mesmo na presença do fármaco, como detoxificação e amplificação do alvo. Esses diferentes

mecanismos, frequentemente mediados por plasmídeos de resistência, corroboram para a rápida disseminação do fenótipo de resistência (Solanki e Das 2024).

Figura 1: Mecanismos de resistência antimicrobiana.



Fonte: Solanki e Das 2024

Após o uso de antibióticos, uma elevação rápida no número de microrganismos que apresentam resistência pode ser observada, seguida de queda gradual com a interrupção do tratamento, tanto em adultos quanto em recém-nascidos (Carlet 2012). Estudos baseados em metatranscriptômica tem demonstrado impacto em adaptações funcionais da microbiota capazes de desencadear resistência antimicrobiana, com aumento da atividade de fenótipos de resistência a múltiplos antibióticos e alguns transportadores de efluxo e no metabolismo de fármacos (Guffey e Loll 2021; Lamaudiere *et al.* 2023; Liu *et al.* 2011a). No entanto, apesar de diversos estudos identificarem alterações na composição da microbiota intestinal, é importante lembrar que a função dessa microbiota pode ser ainda mais relevante, uma vez que bactérias podem utilizar múltiplos segmentos gênicos para sintetizar uma única proteína e podem modular essa síntese em resposta a estímulos no ambiente, desencadeados pelo próprio hospedeiro, outras bactérias ou de organismos não bacterianos, como vírus e fungos (Katsowich *et al.* 2017; Lin *et al.* 2020; Munita e Arias 2016).

O desequilíbrio dessa microbiota tem demonstrado uma importante correlação na gênese de diversas doenças, de modo que a detecção e quantificação de alterações

microbianas tem se tornado uma potencial ferramenta diagnóstica em doenças inflamatórias, metabólicas (obesidade e diabetes), alérgicas e neurológicas, devido evidências crescentes encontradas em estudos em humanos e em modelos animais (Brown *et al.* 2013; Chen *et al.* 2025; Clemente *et al.* 2012; Jandhyala *et al.* 2015; Shi *et al.* 2017).

Diversas espécies bacterianas têm sido associadas ao câncer colorretal, sugerindo um possível papel etiológico na sua patogênese. Estudos anteriores relataram o enriquecimento de microrganismos como *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Akkermansia muciniphila* (Osman *et al.* 2021), bem como *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Solobacterium moorei*, *Porphyromonas gingivalis* e *Parvimonas micra* (Saffarian *et al.* 2019) em pacientes com CCR. Apesar dessas evidências, ainda existem divergências quanto à consistência desses achados. Nesse contexto, uma investigação que combinou meta-análise de cinco *datasets* públicos com dados originais do próprio grupo, totalizando 969 metagenomas fecais, evidenciou a predominância de espécies associadas ao CCR, incluindo algumas frequentemente derivadas da cavidade oral. Entre as mais frequentes estavam *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas* spp., *Porphyromonas asaccharolytica*, *Gemella morbillorum*, *Clostridium symbiosum* e *Parvimonas micra*, sendo *Peptostreptococcus stomatis* a mais representativa (Thomas *et al.* 2019).

Com o objetivo de consolidá-los, uma meta-análise abrangente que incluiu dados de três continentes e quatro coortes étnicas identificou sete espécies bacterianas consistentemente enriquecidas em pacientes com CCR: *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Alistipes finegoldii* e *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, sendo a associação com *B. fragilis* menos pronunciada (Dai *et al.* 2018). Outro estudo recente conduzido por Piccinno *et al.* (2025), que analisou 3.741 amostras provenientes de 18 coortes, nas quais foram aplicadas novas metodologias computacionais de análise em nível de cepa (utilizando perfilhamento metagenômico por *MetaPhlAn 4* e agrupamento genômico em *Species-level Genome Bins* – SGBs), que permitem identificar linhagens específicas mesmo de espécies ainda não cultivadas. Os autores confirmaram o enriquecimento de microrganismos previamente associados ao CCR, destacando *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Bacteroides fragilis*, nesta ordem de força de associação. Entre as subespécies de *F. nucleatum*, as mais associadas foram *animalis*, *vincentii*, *nucleatum* e *polymorphum*. Esses achados reforçam o potencial de tais espécies como biomarcadores para estratégias de diagnóstico não invasivo do CCR.

Sabendo-se que bactérias podem influenciar a inflamação e a resposta à recuperação cirúrgica, além de serem agentes de grande importância em quadros de sepse, avaliamos diferenças na microbiota bacteriana entre pacientes com câncer colorretal que tenham ou não desenvolvido fístulas, identificando aqueles com maior risco de desenvolvimento desta complicação e buscando prevenir a ocorrência deste desfecho.

1.6 Técnicas para estudo da microbiota

A análise metagenômica possibilita a identificação de espécies e linhagens microbianas em ambientes altamente complexos, sem a necessidade de cultivo *in vitro*, representando um avanço significativo na compreensão da diversidade microbiana e superando as limitações impostas pelos métodos tradicionais de isolamento (Caro-Quintero e Konstantinidis, 2012; Rodriguez *et al.* 2021).

Essa é uma abordagem estratégica para acessar grandes volumes de dados genéticos provenientes de comunidades microbianas complexas. A partir da extração do gDNA total dessas comunidades, técnicas como o sequenciamento *shotgun* permitem gerar leituras que refletem, no momento da coleta, características genômicas relevantes, como genes, operons e até genomas completos (Handelsman 2004). No entanto, essa técnica, assim como outras abordagens, pode introduzir viés devido a amostragem inadequada, etapas de extração de DNA ou ainda a composição de GC% do material genético, especialmente quando a amplificação do gDNA total é necessária antes do sequenciamento (McLaren *et al.* 2019; Nayfach e Pollard 2016), além de relevantes vieses que podem ser introduzidos conforme o *pipeline* empregado na análise por bioinformática (Forry *et al.* 2024).

A análise bioinformática das sequências de DNA obtidas durante o sequenciamento permite a avaliação de correlações e comparações de dados entre diferentes estudos, viabilizando inferências sobre aspectos biológicos e ecológicos das comunidades microbianas. Uma métrica frequentemente adotada nesse contexto é a abundância relativa de cada um dos táxons, que leva em consideração a profundidade de cobertura vertical do sequenciamento e a quantidade total de dados obtidos, possibilitando estimativas da representatividade de cada grupo microbiano na amostra analisada (Morton *et al.* 2019).

No entanto, evidências provenientes de estudos metagenômicos têm indicado que, apesar da frequente recombinação genética entre bactérias, muitas espécies podem apresentar fronteiras bem definidas, desafiando a noção anterior de que tais organismos não formariam agrupamentos taxonômicos estáveis (Lawrence 2002; Novick e Doolittle 2019).

1.7 Fístulas anastomóticas (FAs) e microbiota fecal

Diversos fatores podem influenciar a composição da microbiota intestinal, assim como intervenções pré-operatórias e a própria cirurgia podem ter um efeito disruptivo na homeostase metabólica e na capacidade do organismo em resistir a invasões patogênicas. Evidências indicam que pacientes submetidos à cirurgia colorretal que desenvolvem FA apresentam perfis distintos daqueles que não evoluem com essa complicação (Nalluri-Butz *et al.* 2022; Shogan *et al.* 2013).

Estudos em modelos animais têm demonstrado correlação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento de FA, auxiliando na elucidação da causa raiz deste desfecho. No entanto, as técnicas empregadas para desenvolver FA em animais saudáveis, em alguns estudos podem ser grosseiras e incompatíveis com a prática clínica, dificultando um comparativo realista do modelo animal proposto (Alverdy *et al.* 2021).

A influência da microbiota fecal na cicatrização cirúrgica foi investigada em modelo murino por Hajjar *et al.* (2023), por meio do transplante fecal de pacientes com e sem fístula anastomótica em camundongos. Os resultados demonstraram que pacientes que desenvolveram FA apresentavam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no intestino mesmo antes da cirurgia, e esse perfil foi transferido para os camundongos, resultando em pior cicatrização. O estudo também identificou uma correlação entre as espécies *Alistipes onderdonkii* e *Parabacteroides goldsteinii*, bem como com o gênero *Alistipes*, apresentando um desenvolvimento exacerbado no grupo que desenvolveu FA. No entanto, *Parabacteroides goldsteinii* foi associada à redução da produção de citocinas inflamatórias, com potencial de melhora da cicatrização.

Estudos têm evidenciado associação entre bactérias produtoras de collagenases no desenvolvimento de fístulas anastomóticas, sobretudo por sua capacidade de ativar metaloproteinases da matriz (por exemplo, MMP-9), enzimas envolvidas na degradação da

matriz extracelular ou devido seu papel na inflamação por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Shogan *et al.* 2015; Hajjar *et al.* 2023; Komen *et al.* 2014). Espécies como *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* têm sido implicadas nesse processo (Shogan *et al.* 2015; Olivas *et al.* 2012; Shi *et al.* 2022).

A redução na abundância do gênero *Lactobacillus*, observada após procedimentos cirúrgicos, tratamentos oncológicos, uso de antibióticos ou analgésicos, também tem sido associada ao aumento de bactérias collagenolíticas, possivelmente devido a redução dos níveis de fosfato intestinais (Jones *et al.* 2011). Hernández-González *et al.* (2023) também associaram a produção de collagenases e proteases por *Enterococcus* ao desenvolvimento de FA em pacientes com CCR, as quais apresentavam maior virulência através dos genes *gelE* e *agg*. O grupo de Alverdy indicou que apenas as cepas que possuem genes codificadores de collagenases e que expressam essas enzimas *in vivo*, em resposta a sinais ambientais locais, têm a capacidade de ativar proteases do tecido intestinal (como MMP9 e plasminogênio) e causar fístulas (Alverdy *et al.* 2021).

Evidências experimentais demonstram que a abundância do gênero *Enterococcus* pode ser modulada por fatores dietéticos, podendo levar até um mês no pós-operatório para restabelecer a microbiota original. Em modelo animal, uma dieta rica em gordura e pobre em fibras resultou no aumento de *Enterococcus*, além de promover elevação de *Proteobacteria* e uma redução significativa de *Bacteroidetes*. Enquanto a introdução de uma dieta rica em fibras e baixa em gorduras dois dias antes do procedimento foi suficiente para melhorar a diversidade microbiana e reduzir a prevalência de *Enterococcus* (Hyoju *et al.* 2020). Corroborando esses achados, Boatman *et al.* (2023) também observaram associação entre bactérias produtoras de collagenase e o padrão alimentar ocidental (rica em gordura e pobre em fibras).

Ainda em modelos animais, foi demonstrado que a aplicação local de antibióticos resultou na eliminação de *E. faecalis*, levando a uma redução significativa na incidência de FAs (Shogan *et al.* 2014). Outro estudo também avaliou a espécie *E. faecalis* isolada antes e depois da cirurgia, identificando cepas praticamente idênticas (*fsr-gelE-sprE*), porém com maior atividade collagenolítica nos pacientes que desenvolveram FA (Christley *et al.* 2020). Embora *E. faecalis* seja uma espécie comensal encontrada em baixa abundância na microbiota saudável, essa bactéria tem alta capacidade de adquirir resistência antimicrobiana ou genes

de virulência putativa por transferência horizontal de genes, podendo se tornar virulenta (de Almeida, Taddei e Amedei 2018).

Frequentemente *E. faecalis* e *P. aeruginosa* tem sido encontrada na região da anastomose de pacientes com desfecho de FA (Ohigashi *et al.* 2013), corroborando a presença aumentada de *Enterococcus* e *Enterobacter* também observada na mucosa intestinal de anastomoses em modelos animais (Scarborough *et al.* 2015).

Bactérias produtoras de butirato também têm sido associadas à ativação de receptores que levam à produção de ROS, melhorando a regeneração de tecidos e ajudando na manutenção da integridade da barreira intestinal (Bachmann *et al.* 2017; Bedard *et al.* 2007; Collier-Hyams *et al.* 2005; Sen e Roy 2008; Wentworth *et al.* 2010). A presença de butirato, um dos principais metabólitos provenientes da metabolização de SCFA, também tem sido associado a uma redução na presença de *P. aeruginosa*, e por sua vez a redução de FA (Kumar *et al.* 2009; Rolandelli, Buckmire e Bernstein 1997). No entanto, esse equilíbrio é delicado, e o comprometimento da homeostase pode favorecer a proliferação de bactérias aeróbias patogênicas (Bedard *et al.* 2007; Sen e Roy 2008). Um estudo realizado por Zamorano *et al.* (2023) foi desenhado em modelo animal buscando compreender o impacto na microbiota da exposição ao oxigênio, onde foi observada que *Gemella palaticanis* teve sua abundância elevada em ambos os grupos, porém mais significativamente no grupo que desenvolveu FA.

Estudos *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado que *Akkermansia muciniphila* pode atuar como um marcador benéfico, contribuindo para a cicatrização por meio da melhora da integridade da barreira intestinal, estímulo à angiogênese e redução da inflamação (Bachmann *et al.* 2022; Jian *et al.* 2023; Li *et al.* 2016; Liu *et al.* 2020; Reunanen *et al.* 2015; Wade *et al.* 2023). No entanto, sabemos que qualquer microrganismo pode assumir um papel patogênico em contextos de desequilíbrio ecológico, ainda que não esteja claro qual seria o limiar seguro de abundância dessa espécie para que seus efeitos permaneçam benéficos ao hospedeiro (Jian *et al.* 2023), conforme demonstrado por Boatman *et al.* (2023), onde *Akkermansia* e *Bacteroides* foram correlacionadas com o desenvolvimento de FA.

Em 2016, van Praagh *et al.* conduziram um estudo piloto com 16 pacientes utilizando barreira mecânica para proteção anastomótica (c-seal), no qual observaram, em amostras de tecido, uma correlação entre a presença da família *Lachnospiraceae* e uma menor diversidade microbiana com o desenvolvimento de FA. A elevada abundância de *Lachnospiraceae* também

foi associada a índices elevados de IMC, sendo sugerido que essa predominância poderia estar relacionada ao aumento do gênero *Ruminococci*. Posteriormente, em 2019, um estudo mais abrangente com 63 pacientes, realizado pelo mesmo autor, demonstrou que entre aqueles que utilizaram o c-seal, a família *Blautia* apresentou maior abundância nos indivíduos que desenvolveram FA. Por outro lado, entre os pacientes que desenvolveram FA sem a utilização do c-seal houve maior abundância das famílias *Lachnospiraceae* e *Bacteroidaceae*, enquanto no grupo controle a predominância foi das famílias *Prevotella*, *Streptococcus* e *Eubacterium* (van Praagh *et al.* 2019).

Corroborando esses achados, Shi *et al.* (2022) observaram predominância dos gêneros *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* e *Fusobacterium* nos pacientes que desenvolveram FAs, seguido da redução da diversidade alfa. A espécie *F. nucleatum* foi inoculada no cólon de ratos, demonstrando capacidade de degradar colágeno tipo I e II, levando ao desfecho clínico de FA, porém o estudo conclui que o potencial patogênico dessa espécie está principalmente associado à sua capacidade de adesão ao epitélio intestinal.

Um estudo anterior, conduzido por Mima *et al.* (2020), buscou correlacionar a presença do gênero *Bifidobacterium* e das espécies *F. nucleatum*, *Escherichia coli* (pks positiva) e *E. faecalis*, ao desenvolvimento de FA em pacientes com CCR. No entanto, apenas o gênero *Bifidobacterium* apresentou alteração significativa, com abundância aumentada após a cirurgia, demonstrando potencial papel patogênico no desfecho clínico de FA.

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os agentes mais comuns em formulações probióticas, sendo amplamente associados à promoção da integridade da barreira epitelial intestinal e à redução de infecções em pacientes submetidos à cirurgia colorretal (Liu *et al.* 2011b; Mizuta *et al.* 2016). Mizuta *et al.* (2016) demonstraram que a administração pré-operatória de *Bifidobacterium* em pacientes com CCR contribuiu para a redução de bactérias potencialmente patogênicas, como *Enterobacteriaceae*, *Clostridium difficile* e *Pseudomonas* no período pós-cirúrgico. No entanto, embora modelos animais sugiram que probióticos e simbióticos possam favorecer a cicatrização da anastomose, os dados clínicos sobre sua eficácia isolada permanecem inconclusivos. Uma meta-análise conduzida por Xu *et al.* (2023) avaliou o impacto de diferentes intervenções (prebióticos, probióticos, simbióticos e antibióticos) na prevenção de infecções após cirurgia colorretal. Os resultados indicaram que os antibióticos orais foram os mais eficazes na redução de infecções

e na prevenção de fístulas anastomóticas, enquanto probióticos e simbióticos apresentaram benefício na redução de infecções, mas sem impacto significativo na incidência de fístulas.

Na investigação do papel da microbiota intestinal no desenvolvimento de FA, Lehr *et al.* (2024) buscaram entender a relação entre o momento de amostragem da microbiota intestinal, assim como sua localização no intestino. Os autores demonstraram que a composição da microbiota variou significativamente de acordo com o momento da coleta do tecido, principalmente ao comparar amostras obtidas antes e após a cirurgia, no entanto, a localização anatômica da amostragem não apresentou impacto significativo. A diversidade alfa diminuiu ao longo do tempo, tanto para os pacientes com desenvolvimento de fístulas, quanto para os que não tiveram este desfecho. Os gêneros *Prevotella* e *Faecalibacterium* foram encontrados em maior abundância em FA, e *Phocaeicola* e *Ruminococcus* no grupo controle.

Palmisano *et al.* (2020) não identificaram correlação entre *Faecalibacterium prausnitzii* e o desenvolvimento de FA, embora tenham observado uma redução significativa dessa espécie em indivíduos saudáveis quando comparado a pacientes com CCR. O autor também demonstrou que pacientes com CCR apresentaram elevação moderada da abundância de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e uma redução também moderada de *Firmicutes* e *Actinobacteria*. E quando os pacientes com e sem desfecho de fístula foram comparados, as espécies *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Odoribacter ianeus* e *Hafnia alvei* foram identificadas como promotoras de disbiose e as espécies *Faecalibacterium prausnitzii* e *Barnesiella intestinihominis* com potencial ação protetiva.

Conforme abordado anteriormente, o benefício na utilização de PIM e profilaxia antibiótica ainda apresentam divergências. Quando PIM é realizado isoladamente, observa-se uma redução na abundância de bactérias comensais benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, acompanhada por um aumento de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus*. A associação entre PIM e profilaxia antibiótica promove uma redução ainda mais acentuada na diversidade microbiana, eliminando praticamente todas as bactérias anaeróbicas estritas e favorecendo a proliferação de anaeróbias facultativas, como *Enterococcus faecalis* (Harrell *et al.* 2012; Jalanka *et al.* 2015). Esse desequilíbrio pode persistir por um período prolongado, sendo necessário pelo menos 30 dias para que a microbiota retorne a um estado semelhante ao pré-operatório (d'Humières *et al.* 2024; Nalluri-Butz *et al.* 2022).

A presente revisão evidencia a crescente relevância da microbiota intestinal como fator determinante nos desfechos pós-operatórios de pacientes submetidos à ressecção colorretal, especialmente no desenvolvimento de fístulas anastomóticas. Diversos estudos têm destacado populações microbianas específicas e possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos na cicatrização anastomótica, contribuindo para o avanço do conhecimento nesta área, embora limitações metodológicas ainda estejam presentes, como a heterogeneidade das amostras, a variação nos métodos analíticos e o número reduzido de participantes. Evidências atuais sugerem que a disbiose intestinal, processos inflamatórios e a degradação da matriz extracelular podem desempenhar um importante papel nesse processo multifatorial.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a composição da microbiota intestinal de pacientes com câncer colorretal submetidos ao tratamento cirúrgico, investigando a possível associação desta com a ocorrência de fístulas anastomóticas.

2.2 Específicos

- Avaliar possíveis correlações entre fatores ambientais, epidemiológicos e clínicos na ocorrência de fístulas em pacientes com câncer colorretal;
- Determinar a composição da microbiota bacteriana em amostras de fezes, pré e pós-terapia antimicrobiana usada na rotina da preparação cirúrgica, para pacientes com e sem fístulas, pela abordagem de sequenciamento de DNA total (*shotgun*);
- Buscar correlacionar a presença de determinados microrganismos, em conjunto ou isoladamente - de modo qualitativo e quantitativo - ao desenvolvimento de FAs em pacientes com tratamento cirúrgico do câncer colorretal;
- Estudar o impacto da antibioticoterapia na composição da microbiota fecal e seu reflexo no desenvolvimento das fístulas anastomóticas;
- Avaliar na microbiota fecal, a ocorrência e a frequência de genes de resistência antimicrobiana, e sua associação com a ocorrência de FAs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC) em 2021, sob o parecer nº 2835-20D (Anexo A). Apenas após aprovação pelo CEP institucional, foi iniciado o recrutamento de pacientes para o estudo. Todos os pacientes potencialmente elegíveis foram apresentados ao estudo e estes foram convidados a participarem de forma voluntária, garantido a cada participante o tempo necessário para refletir sobre sua decisão, sem qualquer obrigatoriedade de resposta imediata, e com toda a liberdade de excluírem sua participação amostras e dados obtidos, a qualquer momento. A coleta de dados clínicos e amostras biológicas foi realizada somente após a leitura, compreensão e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

3.2 População de estudo e agrupamento para análise

O presente estudo é uma coorte prospectiva, recrutada no A.C.Camargo Cancer Center, em São Paulo – SP, composta por pacientes diagnosticados em série com adenocarcinoma colorretal e submetidos a tratamento cirúrgico na mesma instituição entre os anos de 2021 e 2023.

A casuística total do estudo incluiu 223 pacientes recrutados consecutivamente e seguidos no período pós-cirúrgico, com o objetivo de formar dois grupos, divididos conforme a presença ou ausência de FA, considerando sua ocorrência até 30 dias após o procedimento cirúrgico. A princípio buscamos coletar, de todos os sujeitos, todas informações pertinentes e as amostras necessárias. Os pacientes foram inicialmente separados em dois grupos: **1)** com FAs e **2)** sem registro de FAs em uma janela de até 30 dias do momento da cirurgia. Como se trata de um estudo prospectivo, no momento de entrada no estudo e coleta de amostras não há como fazer o pareamento entre os casos do grupo 1 e do grupo 2. Tal pareamento foi sempre feito *a posteriori* onde os critérios ideais de pareamento envolvem, na seguinte ordem de prioridade: 1) gênero, 2) localização do tumor, 3) idade dos pacientes (dentro de um

intervalo de (± 6 anos) e 4) estadiamento clínico. Além dessas quatro variáveis principais, que nortearam a seleção dos indivíduos, também foram considerados, sempre que possível, outros fatores relevantes, como obesidade, diabetes, classificação ASA, estadiamento patológico e tratamento neoadjuvante.

Com o objetivo de ampliar o poder estatístico das análises, incluindo distintos critérios de pareamento (relatado nos resultados obtidos), montamos grupos de comparação, dentro das possibilidades de um estudo de vida real, realizado durante o prazo do estudo. Durante a montagem dos grupos, aqui chamados de Grupos de Estudo (GE), buscamos parear cada caso com seus controles dentre as proporções de 1:2 a 1:5, conforme comportamento e distribuição de casos em cada grupo (**Tabela 2**).

3.3 Critérios de inclusão

- Pacientes portadores de adenocarcinoma de cólon ou de reto, submetidos à ressecção cirúrgica seguida de anastomose, operados no A.C.Camargo Cancer Center;
- Pacientes com idade superior a 40 anos;
- Pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE.

3.4 Critérios de exclusão

- Pacientes que recusaram tratamento cirúrgico;
- Pacientes que não aceitaram participar deste estudo;
- Cirurgias de urgência por obstrução ou perfuração tumoral;
- Pacientes em uso crônico de corticosteroides;
- Pacientes com amputação de reto sem anastomose.

3.5 Desfecho principal

Ocorrência de fístula anastomótica nos primeiros 30 dias pós-operatórios, definida por qualquer sinal clínico, radiológico ou endoscópico de vazamento da anastomose intestinal.

3.6 Desfechos secundários

- Taxa de infecção de sítio cirúrgico (infecção de ferida operatória ou coleção infectada intra-abdominal);
- Taxa de complicações maiores pela escala de Clavien-Dindo, definidas como complicações graus 3 a 5;
- Taxa de mortalidade pós-operatória (até 60 dias);
- Tempo de internação hospitalar.

3.7 Coleta de dados clínicos e epidemiológicos

A coleta de dados clínicos, epidemiológicos, hábitos alimentares, estilo de vida, dados de *follow-up*, e demais informações pertinentes à doença e ao tratamento foi realizada pela análise de prontuários médicos e aplicação de um questionário estruturado ao paciente. Este questionário (Apêndice C) foi adaptado a partir de um instrumento previamente validado em estudo conduzido pelo grupo, intitulado "*Avaliação da composição da microbiota gástrica e sua correlação com o conteúdo de fibras na dieta de pacientes com adenocarcinoma gástrico e controles sem câncer*".

O Centro de Referência de Tumores Colorretais do A.C.Camargo Cancer Center adota um protocolo de recuperação acelerada, aos moldes do protocolo ERAS® (Francis *et al.* 2016), desde 2016, para todas as cirurgias colorretais eletivas. No período de vigência desse estudo, o protocolo prevê: imunomodulação pré-operatória com suplemento oral (Impact®) sete dias antes da cirurgia; uso de antibióticos por via oral 18 horas antes da cirurgia (Metronidazol e Neomicina); preparo intestinal mecânico, por meio de enema glicerinado por via retal duas horas antes da cirurgia; profilaxia antibiótica endovenosa com cefoxitina iniciada na indução anestésica e mantida até 24 horas após a cirurgia.

As informações foram levantadas com o auxílio da equipe do Centro de Referência de Tumores Colorretais do A.C.Camargo Cancer Center, pela equipe de cirurgia colorretal (Dr. Samuel Aguiar Jr, Dra. Renata Takahashi, Dr. Tiago Bezerra, Dr. Tomas Marques, Dr. Wilson Toshihiko) e pela enfermeira de pesquisa Dra. Bruna Catin. Todas as informações estão organizadas em banco estruturado na ferramenta RedCap.

3.8 Coleta e processamento do material biológico

Neste estudo, foram coletadas amostras biológicas com o objetivo de caracterizar a microbiota intestinal. As coletas incluíram uma primeira amostra de fezes obtida antes da antibioticoterapia e do procedimento cirúrgico (coleta 1), e uma segunda amostra coletada após a administração dos antibióticos e a realização da cirurgia (coleta 2).

A antibioticoterapia profilática foi realizada com os medicamentos Metronidazol 250mg e Neomicina 500mg, via oral, onde foram administradas 2 doses de cada medicamento nos intervalos de 19h, 18h e 8h horas antes do procedimento cirúrgico.

Outros materiais foram coletados durante o andamento deste trabalho - incluindo líquido peritoneal e fragmentos das bordas proximal e distal do segmento de cólon ou reto ressecado - visando o estudo de sua microbiota. No entanto, devido a pequena biomassa de microrganismos, seu estudo se mostrou inviável em nosso trabalho. Assim, os dados referentes a essas coletas e seus respectivos resultados não serão apresentados no corpo da tese, estando disponíveis no Apêndice A.

Todas as amostras foram coletadas pela aluna em conjunto com a equipe do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, com o apoio de médicos, residentes e técnicos. Inicialmente, o armazenamento foi realizado pelo Biobanco, sendo posteriormente as amostras encaminhadas ao CIPE pela aluna.

As amostras de fezes foram coletadas antes da cirurgia (coleta 1) utilizando um kit de coleta disponibilizado ao paciente, composto por um tubo cônico de 50mL, contendo 3mL de DNA/RNA Shield (Zymo Research, EUA), uma espátula estéril, um coletor de fezes (Coloff) e instruções impressas para a correta realização da coleta. A conservação das fezes na solução de DNA/RNA Shield permite que o material fique a temperatura ambiente por até 60 meses após a coleta e inativa de imediato eventuais patógenos presentes nas amostras (vírus, bactérias e eucariotos). Os pacientes foram orientados a realizar a coleta antes do início do uso profilático de antibióticos para a cirurgia.

As amostras de fezes coletadas após a cirurgia (coleta 2) foram obtidas a partir de resíduos de fezes presentes na peça cirúrgica. Quando não havia fezes na peça, foram coletados da mucosa da peça cirúrgica. Essas amostras foram encaminhadas ao Departamento

de Anatomia Patológica, acondicionadas em criotubos fornecidos pelo estudo, contendo 0,5mL de DNA/RNA Shield e imediatamente congelados a -80°C após a coleta.

3.9 Extração de ácidos nucleicos (DNA)

A extração de DNA das amostras biológicas foi realizada utilizando o *kit EZNA® Universal Pathogen Kit* (Omega Bio-tek, EUA), através do protocolo de extração de DNA para fezes, com modificações padronizadas estabelecidas previamente pelo grupo, com o objetivo de otimizar a lise celular e obter maior homogeneização das amostras.

As adaptações incluíram o aumento do tempo de vórtex (lise física) de 5 para 10 minutos, o aumento da quantidade de proteinase-K (20 µg/µL) de 20 µL para 40 µL, e a elevação do tempo de incubação de 15 para 30 minutos.

Após a extração, o DNA de todas as amostras foi quantificado utilizando o *Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram então aliquotadas e armazenadas a -20°C até a etapa de amplificação e sequenciamento.

3.10 Sequenciamento de DNA total (*shotgun*)

Para análise da composição da microbiota fecal foi empregada a técnica de sequenciamento de DNA total (*shotgun metagenomics*), visando a investigação de todos os organismos presentes neste material, além do potencial metabólico/enzimático da microbiota e presença de genes de resistência a antibióticos. A análise da microbiota fecal foi feita com pelo menos 3.6 milhões de sequências por amostra.

As amostras foram previamente purificadas com esferas magnéticas Ampure XP Beads (Beckman Coulter, EUA), na proporção de 1:1, com o objetivo de remover fragmentos menores de 100 pb. Em seguida, foram quantificadas com o *Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A construção das bibliotecas foi realizada conforme protocolo recomendado pelo fabricante (Illumina, EUA), utilizando o *kit Illumina DNA Prep with Tagmentation* em conjunto com os adaptadores *Nextera DNA CD Indexes* (Illumina, EUA). Foram utilizadas massas entre 100ng e 500ng de DNA (valores dentro da faixa recomendada pela plataforma), com exceção de 7 amostras, onde foram utilizadas massas inferiores a 100ng

(protocolo adaptado conforme orientação do fabricante). As bibliotecas amplificadas foram avaliadas quanto à qualidade e tamanho dos fragmentos por meio de eletroforese capilar no *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA), e quantificadas por PCR em tempo real com o *KAPA Library Quantification Kit* (Roche, EUA). O sequenciamento foi realizado na plataforma *NextSeq 500* (Illumina, EUA), utilizando o *NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5* (300 ciclos), com capacidade de gerar até 400 milhões de leituras por corrida.

A construção das bibliotecas e sequenciamento foram conduzidas no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center com auxílio da *Facility* de sequenciamento do CIPE (técnica responsável - Dra. Bruna Barros).

3.10.1 PROCESSAMENTO, FILTRAGEM E ANÁLISES DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS

As sequências obtidas passaram por processamento com *pipeline* estruturado pelo grupo de Bioinformática juntamente com o Laboratório de Genômica Médica do A.C.Camargo Cancer Center, baseando-se no *workflow* do Kraken2 (Lu *et al.* 2022a).

Os dados brutos em formato FASTQ, sem filtros, foram processados usando o programa Kraken2 utilizando os parâmetros padrão, exceto “--minimum-base-quality 5 --confidence 0.1 --threads 10 --db k2_plusfp_20210127”. Por fim, a abundância relativa foi calculada pelo *software* bracken (Lu *et al.* 2017) utilizando os parâmetros padrão, exceto “-d k2_plusfp_20210127 -r 50 -l S -t 10”. A anotação taxonômica foi estabelecida utilizando os bancos de dados Kraken e PlusPFP. Demais análises e processamento dos resultados foram realizados com a linguagem R v4.4 (R Core Team 2024).

Ao final do processamento e aplicação dos filtros de qualidade, foram geradas curvas de rarefação com as sequências remanescentes, a fim de verificar se todas as amostras haviam atingido o ponto de saturação, garantindo que toda a diversidade bacteriana presente em cada amostra fosse adequadamente avaliada pelo sequenciamento. A partir dessa verificação, foram conduzidas as análises comparativas subsequentes.

Os dados foram inicialmente submetidos à avaliação da normalidade e homogeneidade de variância, a partir da qual foram selecionados os testes estatísticos apropriados, sejam paramétricos ou não-paramétricos, para a comparação da diversidade alfa (índices *Observed*, Shannon e Simpson) entre os grupos de interesse. Para a análise de diversidade beta (índices

Bray-Curtis, Jaccard e Canberra), foram aplicados os testes multivariados ANOSIM e PERMANOVA. A identificação de táxons diferencialmente abundantes entre os grupos foi realizada por meio do método MaAsLin2 (Mallick *et al.* 2021).

3.10.2 ANÁLISE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (AMR)

A identificação de genes associados à resistência a agentes antimicrobianos foi realizada utilizando o pipeline da plataforma CZID (Alcock *et al.* 2023).

No *pipeline* os dados brutos com as sequências no formato FASTQ foram pré-processados para controle de qualidade pelo software kneaddata (Huttenhower, 2025), utilizando os parâmetros padrão, exceto pelo uso de “--bypass-trim -t 4 -max-memory 40G -db grch37”, para filtro de sequências alinhadas contra o genoma humano na versão da montagem do GRCh37/hg19 (R Core Team 2024).

As sequências em formato FASTQ e filtradas (sem reads humanos) foram submetidas à análise por meio do módulo de resistoma, que compara os dados contra bancos de dados públicos curados, como o CARD e o NDARO, empregando algoritmos baseados em similaridade e cobertura de leitura (Lu *et al.* 2025a). Apenas genes com níveis de detecção consistentes e acima do limite mínimo de confiabilidade da ferramenta foram considerados para interpretação posterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população amostral do estudo foi coletada entre agosto de 2021 e fevereiro de 2023, totalizando 223 indivíduos, dos quais 12 foram excluídos, sendo 7 devido ao desenvolvimento de outros tipos de fístula e 5 devido a outras intercorrências. No grupo caso, 21 indivíduos foram incluídos por terem desenvolvido fístula anastomótica, representando uma frequência de 9,95% de ocorrência de FAs em pacientes submetidos à cirurgia colorretal no Hospital A.C.Camargo Cancer Center nesta população, durante este período.

O pareamento dos indivíduos do grupo caso com o grupo controle foi realizado considerando fatores que pudessem melhor agrupar os tumores para efeitos comparativos, de modo a estudar a ocorrência de FAs com critérios distintos. Assim, conforme citado anteriormente (**Tabela 2**), estabelecemos três grupos de análises comparativas entre indivíduos com FAs (casos) ou sem FAs (controles): GE1) indivíduos pareados por sexo, localização do tumor, idade (± 6 anos) e estadiamento clínico (localizado, localmente avançado ou metastático); GE2) pareamento feito apenas por sexo e localização; GE3) grupos considerando apenas a presença ou ausência de fístulas anastomóticas. As amostras dos indivíduos selecionados nos grupos GE1 e GE2, quando disponíveis, foram sequenciadas e analisadas por bioinformática (**Figura 2**).

Figura 2: Distribuição dos pacientes nos Grupos de Estudo (GE).

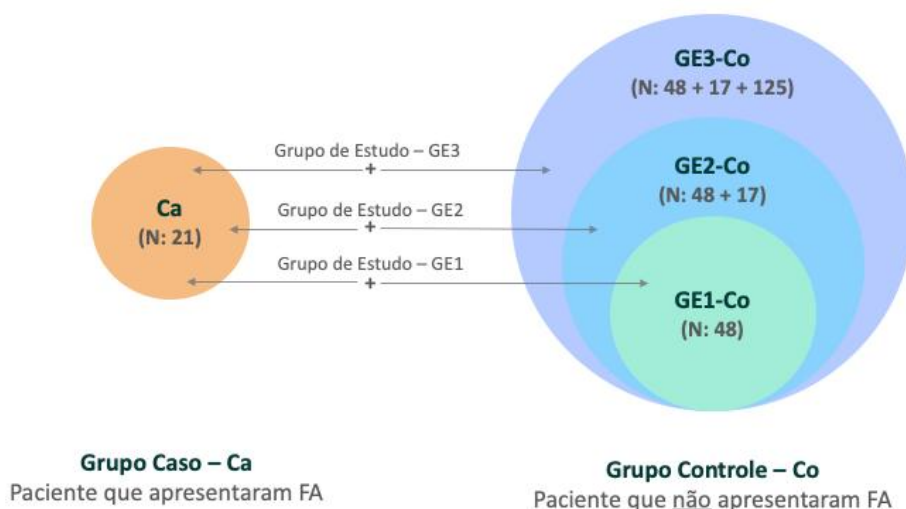


Tabela 2: Agrupamento dos pacientes recrutados – Grupos de Estudo (GE)

Grupo de Estudo 1 (GE1) Total= 69 pacientes	
Grupo Caso (Ca – N:21) 21 pacientes com fistula anastomótica.	Grupo Controles (Co – N:48) 48 pacientes Pareamento por: - Gênero; - Localização do tumor; - Idade ($\pm$ 6 anos); - Estadiamento clínico.
Nota: Os pacientes destes grupos tiveram suas amostras sequenciadas quando disponível, totalizando 142 amostras; ** Paciente_106 foi pareado com 2 pacientes localmente avançados mesmo sendo metastático.	
Grupo de Estudo 2 (GE2) Total= 86 pacientes	
Grupo Caso (Ca – N:21) 21 pacientes com fistula anastomótica.	Grupo Controles (Co – N:69) 65 pacientes sem fistula anastomótica. Pareados por: - Gênero; - Localização do tumor.
Nota: Os pacientes de GE2-Co incluem todos os controles de GE1-Co, acrescidos de 17 novos controles, não-pareados (em relação aos casos com FAs) em termos de idade e de estadiamento clínico.	
Grupo de Estudo 3 (GE3) Total= 211 pacientes	
Grupo Caso (Ca – N:21) 21 pacientes com fistula anastomótica.	Grupo Controles (Co – N:190) 190 pacientes sem fistula anastomótica. Pareados por: - Ausência de fístula anastomótica.
Nota: Os pacientes de GE3-Co incluem todos os controles anteriores, acrescidos de 125 novos controles sem FAs	

Cada caso foi pareado com pelo menos 2 controles (proporção mínima de 1:2) no Grupo de Estudo 1 (GE1), exceto para 2 pacientes (paciente_158 e paciente_196), onde não foi possível realizar esse pareamento, sendo adotado o pareamento 1:1. No Grupo de Estudo 2 (GE2), buscamos aumentar o N amostral e para isso foi necessário reduzir os critérios usados no pareamento (não sendo possível manter pareamento por idade e por estadiamento clínico).

Ao longo do estudo, algumas amostras de fezes pré-cirurgia não puderam ser coletadas devido à logística das consultas dos pacientes, enquanto outras foram perdidas ou deixaram de ser coletadas pelos pacientes. Deste modo, para dois pacientes do grupo caso nenhuma amostra foi coletada e outros três pacientes não tiveram as duas amostras de fezes coletadas, impactando as análises de DNA total (**Tabela 3**).

Tabela 3: Amostras coletadas ao longo do estudo.

	Casos (n=21)	GE1-Co (n=48)	GE2-Co (n=65)	GE3-Co (n=190)
Fezes Coleta 1	12	37	49	144
Fezes Coleta 2	18	47	63	154

Para facilitar a discussão deste trabalho, o termo *Grupo Controle* será utilizado para referir se à soma dos indivíduos do GE1-Co. Nos casos em que for necessário especificar os grupos de estudo separadamente, eles serão identificados conforme mencionado anteriormente: GE1-Co, GE2-Co e GE3-Co. Ressaltando que o grupo GE2-Co sempre corresponde à soma dos indivíduos do grupo GE1-Co acrescidos de 17 novos controles (não pareados em termos de idade e estadiamento clínico) e o GE3-Co é a soma de todos os controles anteriores, acrescidos de 125 novos controles sem fístula.

4.1 Dados clínicos

4.1.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A maioria dos indivíduos recrutados nos grupos caso e controle do GE1 foram do sexo masculino (Ca=16, Co=33; 71%) com média de idade de 63 anos. No grupo caso, a mediana de idade foi de 61 (variando entre 43 e 80 anos) anos, mesmo valor obtido para os controles (variando entre 42 e 84 anos). A maioria dos indivíduos apresentou algum tipo de comorbidade (Ca=20, Co=43; 91,3%), sendo a hipertensão a comorbidade mais frequente (n=32; 46,4%), seguido de diabetes (n=19; 27,5%). No entanto, a presença ou ausência dessas comorbidades não mostrou correlação com a ocorrência de FAs (**Tabela 4**).

O hábito de tabagismo apresentou associação significativa com a ocorrência de fístula ($p=0,038$), em concordância com dados previamente descritos na literatura (Jannasch *et al.* 2015; Sorensen *et al.* 2005; Kwak *et al.* 2017). O perfil socioeconômico dos integrantes demonstrou uma tendência sem significado estatístico ($p=0,081$), cabendo notar o baixo número de pacientes atendidos pelo SUS. No entanto, ao ampliar o número amostral com a inclusão do GE2-Co, a análise demonstrou-se significativa ($p=0,044$), sendo observada fístula

anastomótica em 75,0% (n=3; total=4) dos indivíduos atendidos pelo SUS, em contraste com 22,0% (n=18; total=82) daqueles atendidos por convênios ou de forma particular. Devido ao pequeno N amostral do grupo SUS, e o resultado de p sendo limítrofe, sem correções para análises múltiplas, este achado deve ser interpretado com cautela. Comorbidades que afetam a coagulação, demonstraram ausência de correlação com significado estatístico, porém limítrofe (p= 0,057).

A mortalidade entre os pacientes que desenvolveram fístula permaneceu inferior a 10%, com dois óbitos registrados até 60 dias após o procedimento cirúrgico, enquanto nenhum óbito foi observado no grupo controle. Esses valores estão dentro das faixas relatadas na literatura, que variam de 2% a 16% para pacientes com fístula (Bakker *et al.* 2014, Boström *et al.* 2018, Branagan e Finnis 2005, Frasson *et al.* 2016). Apesar da diferença observada, a análise estatística indicou apenas uma tendência à significância (p=0,090), a qual se intensificou ao expandir o número amostral com a inclusão do GE2-Co (p=0,057), embora ainda não tenha atingido significância estatística.

Tabela 4: Características gerais dos 69 pacientes recrutados pelo estudo (GE1).

Variáveis	Fístula		Valor de p
	Não	Sim	
Quantitativa	48 (n)	21 (n)	
Idade			
Média (DP)	63±11 (48)	63±11 (21)	0,966 ^a
Mediana (min-max)	61 (42-84)	61 (43-80)	
IMC			
Média (DP)	27±4 (48)	27±4 (21)	0,338 ^a
Mediana (min-max)	26 (17-42)	28 (18-38)	
Qualitativas			
Sexo			
Masculino	68,8% (33)	76,2% (16)	0,580 ^b
Feminino	31,3% (15)	23,8% (5)	
Tabagista			
Não	70,8% (34)	52,4% (11)	0,038^d
Sim	0% (0)	14,3% (3)	
Ex-tabagista	29,2% (14)	33,3% (7)	
Etilismo			
Não	91,7% (44)	81% (17)	0,235 ^c
Sim	8,3% (4)	19% (4)	
Atividade física*			
Não	51,1% (24)	55% (11)	0,796 ^b
Sim	48,9% (23)	45% (9)	
Comorbidade			
Não	10,4% (5)	4,8% (1)	0,659 ^c
Sim	89,6% (43)	95,2% (20)	
Diabetes			
Não	72,9% (35)	71,4% (15)	1,000 ^b
Sim	27,1% (13)	28,6% (6)	
Obesidade			
Não	83,3% (40)	85,7% (18)	1,000 ^c
Sim	16,7% (8)	14,3% (3)	
Hipertensão			
Não	47,9% (23)	66,7% (14)	0,193 ^b
Sim	52,1% (25)	33,3% (7)	
Anemia			
Não	89,6% (43)	85,7% (18)	0,692 ^c
Sim	10,4% (5)	14,3% (3)	
Coronária			
Não	95,8% (46)	85,7% (18)	0,161 ^c
Sim	4,2% (2)	14,3% (3)	
Anticoagulação			
Não	100% (48)	90,5% (19)	0,090 ^c
Sim	0% (0)	9,5% (2)	
ASA			
I/II	77,1% (37)	81% (17)	1,000 ^c
III/IV	22,9% (11)	19% (4)	
Fonte de pagamento			
Convênio / Particular	97,9% (47)	85,7% (18)	0,081 ^c
SUS	2,1% (1)	14,3% (3)	
Mortalidade**			
Não	100% (48)	90,5% (19)	0,090 ^c
Sim	0% (0)	9,5% (2)	

*: não foram encontradas informações para todos os pacientes.

**: Foram considerados óbitos dentro de 60 dias após procedimento cirúrgico.

a: Teste Man-Whitney; b: Teste Qui-quadrado de Pearson; c: Teste exato de Fisher; d: Teste exato de Fisher-Freeman-Halton

Na **Tabela 5**, podemos ver que as características oncológicas, como estadiamento clínico, classificação TNM e localização do tumor foram similares entre os casos e controles, apenas três pacientes apresentaram doença metastática no estadiamento clínico (Ca=2, Co=1; 4,3%) corroborando o estadiamento patológico (onde tivemos os mesmos números). A maioria dos pacientes apresentou doença localizada ao diagnóstico (n=62; 89,9%), onde 52,2% (n=36) foram classificados como níveis I e II, no estadiamento patológico, seguido de 43,5% (n=30) no nível III, o que está de acordo com o estadiamento patológico, que quando agrupado, somam 95,7% (n=66) dos pacientes com níveis I, II e III, reforçando a concordância entre os achados clínicos e patológicos.

O agrupamento dos tipos de cirurgia foi realizado baseado em características anatômicas e vasculares que diferenciam os sítios cirúrgicos. Esse agrupamento demonstrou sua influência sobre a ocorrência de FA (p=0,018), onde 52,4% (n=11) dos casos ocorreram em procedimentos realizados na região retal. As cirurgias de ressecção anterior baixa com ETM foram mais comuns em pacientes do sexo masculino jovens, com idade até 60 anos (Ca=2, Co=3; 83,3%), assim como as cirurgias de ressecção anterior do reto com excisão parcial do mesorreto, que também apresentaram frequência elevada em pacientes do sexo masculino (Ca=8, Co=8; 88,9%), com prevalência na faixa etária entre 50 e 75 anos (n=15; 83,3%), dos quais 50,0% (n=9) dos pacientes desenvolveram fístula, sendo 88,9% (n=8) dos casos em indivíduos do sexo masculino.

As cirurgias por via de acesso aberta foi a única que apresentou maior prevalência no grupo caso (n=5; 23,8%), enquanto a por via robótica teve distribuição semelhante entre os grupos. A maioria dos casos de FA (n=14, 66,7%) ocorreu em pacientes submetidos à cirurgia por videolaparoscopia.

A intransponibilidade da colonoscopia nos exames pré-operatórios foi associada a um risco aumentado de desenvolvimento de fístula anastomótica. No grupo controle, apenas 10,4% (n=5) dos pacientes apresentavam intransponibilidade, enquanto no grupo caso essa taxa foi de 45,0% (n=9, p=0,003).

Apenas um paciente em cada grupo não fez a profilaxia antibiótica no pré-operatório, permitindo que mais de 97,0% (n=67) dos pacientes no estudo estejam sob o mesmo regime profilático.

Tabela 5: Dados oncológicos, terapêuticos e cirúrgicos dos pacientes do estudo (GE1).

Variáveis	Fístula		Valor de p
	Não	Sim	
Qualitativas	48 (n)	21 (n)	
Tamanho do tumor			
T0/T1/T2	56,3% (27)	42,9% (9)	0,433 ^b
T3/T4/Tx	43,8% (21)	57,1% (12)	
Metástase linfonodal			
N0	68,8% (33)	61,9% (13)	0,782 ^b
N1/N2/N3/N+	31,3% (15)	38,1% (8)	
Metástase distante			
0	97,9% (47)	90,5% (19)	0,218 ^c
1	2,1% (1)	9,5% (2)	
Estadiamento patológico			
I/II/III	97,9% (47)	90,5% (19)	0,218 ^c
IV	2,1% (1)	9,5% (2)	
Estadiamento clínico			
Localizado	91,7% (44)	85,7% (18)	0,352 ^d
Localmente avançado	6,3% (3)	4,8% (1)	
Metastático	2,1% (1)	9,5% (2)	
Localização			
Ceco e cólon ascendente/Cólon transverso	45,8% (22)	28,6% (6)	0,466 ^d
Cólon descendente/Sigmoide e reto alto	47,9% (23)	61,9% (13)	
Reto extra peritoneal	6,3% (3)	9,5% (2)	
Tipo de cirurgia			
Colectomia direita	33,3% (16)	4,8% (1)	0,018 ^b
Colectomia direita estendida (transverso)	10,4% (5)	23,8% (5)	
Colectomia total			
Colectomia esquerda			
Sigmoidectomia	29,2% (14)	19% (4)	
Retossigmoidectomia com anastomose alta			
Ressecção anterior baixa com ETM			
Ressecção anterior do reto com excisão parcial do mesorreto	27,1% (13)	52,4% (11)	
Anastomose*			
Mecânica extracorpórea	12,8% (6)	19% (4)	0,831 ^d
Mecânica intracorpórea	12,8% (6)	9,5% (2)	
Manual	74,5% (35)	71,4% (15)	
Indocianina			
Não	64,6% (31)	42,9% (9)	0,116 ^b
Sim	35,4% (17)	57,1% (12)	
Ileostomia de proteção			
Não	89,6% (43)	66,7% (14)	0,036 ^b
Sim	10,4% (5)	33,3% (7)	
Via de acesso			
Videolaparoscopia	83,3% (40)	66,7% (14)	0,134 ^d
Robótica	10,4% (5)	9,5% (2)	
Aberta	6,3% (3)	23,8% (5)	
Tratamento neoadjuvante			
Não	91,7% (44)	90,5% (19)	0,523 ^d
OUTRO	8,3% (4)	4,8% (1)	
RAPIDO	0% (0)	4,8% (1)	
Quimioterapia adjuvante*			
Não	57,8% (26)	63,2% (12)	0,784 ^b
Sim	42,2% (19)	36,8% (7)	
Colonoscopia*			
Completa	89,6% (43)	55% (11)	0,003 ^b
Intransponível	10,4% (5)	45% (9)	
Antibiótico oral no pré-operatório			
Não	2,1% (1)	4,8% (1)	0,519 ^c
Sim	97,9% (47)	95,2% (20)	

*: não foram encontradas informações para todos os pacientes.

a: Teste Man-Whitney; b: Teste Qui-quadrado de Pearson; c: Teste exato de Fisher; d: Teste exato de Fisher-Freeman-Halton.

Quando avaliada a ocorrência de FAs frente a outras complicações pós-cirúrgicas e o suporte terapêutico necessário, observou-se uma associação consistente entre as variáveis analisadas (**Tabela 6**).

Dada a gravidade inerente ao desfecho de fístula, o grupo caso apresentou classificação Clavien-Dindo elevada, com complicações graves correspondendo a 90,0% dos casos (n=18) e apenas 10,0% (n=2) apresentando complicações leves ou moderadas. No grupo controle, por sua vez, as complicações observadas foram majoritariamente leves ou moderadas (n=11; 68,8%), evidenciando uma distinção clara entre os grupos estudados ($p < 0,001$).

Os achados clínicos secundários, como outras infecções e íleo adinâmico indicam uma relação estatisticamente robusta entre os grupos ($p < 0,001$; $p = 0,008$). Nenhum paciente do grupo controle (n=47) evoluiu com infecções adicionais, enquanto esse desfecho ocorreu em 45,0% (n=9) dos indivíduos no grupo caso. Da mesma forma, os casos de íleo adinâmico foram mais expressivos entre os casos (n=11; 52,4%), enquanto no grupo controle a taxa encontrada foi de 18,8% (n=9).

O uso de sonda nasogástrica (SNG) nos casos de íleo prolongado foi necessário em 21,7% (n=15) dos pacientes. Ao considerar a presença de fístula, observou-se que 89,6% (n=43) dos indivíduos do grupo controle não necessitaram deste suporte, enquanto no grupo caso, mais da metade (52,4%; n=11; $p < 0,001$) precisou de SNG diante à evolução para íleo prolongado. A utilização de nutrição parenteral total (NPT) seguiu um padrão semelhante, sendo necessária para 23,2% (n=16) dos pacientes e quando considerada a presença de fístula, identificamos que 89,6% (n=43) dos indivíduos do grupo controle não necessitaram de NPT, enquanto no grupo caso, essa necessidade foi observada em 52,4% (n=11; $p < 0,001$).

Os casos de reoperação aconteceram exclusivamente nos pacientes que desenvolveram fístula anastomótica, com uma frequência de 71,4% (n=15), evidenciando seu impacto no prognóstico do paciente, onde observou-se um aumento de 300% no tempo de internação ($n = 15 \pm 9 / 5 \pm 4$; $p < 0,001$). O protocolo de alta hospitalar adotado no A.C. Camargo Cancer Center, prevê alta em 3 dias após cirurgias colorretais. A mediana do tempo de internação obtida no grupo controle foi de 3 dias, alinhando-se a este protocolo, enquanto no grupo caso, a mediana foi de 13 dias.

O suporte em unidade de terapia intensiva (UTI) foi necessário em 34,8% (n=24) dos pacientes do estudo, sendo que 57,1% (n=12; $p = 0,014$) ocorreram no grupo caso. Transfusões

sanguíneas foram menos frequentes nos controles, registrando-se em 8,7% (n=6) dos participantes, apresentando maior incidência no grupo caso (n=4; p=0,065; 19,0%).

Tabela 6: Desfechos clínicos secundários e suporte terapêutico dos pacientes submetidos à cirurgia colorretal (GE1).

Variáveis	Fístula		Valor de p
	Não	Sim	
Qualitativas	48 (n)	21 (n)	
Clavien-Dindo*			
1/2	68,8% (11)	10,1% (2)	<0,001 ^b
3/4/5	31,3% (5)	90% (18)	
Outras infecções			
Não	100% (48)	55,0% (11)	<0,001 ^c
Sim	0% (0)	45,0% (9)	
Íleo adinâmico			
Não	81,3% (39)	47,6% (10)	0,008 ^b
Sim	18,8% (9)	52,4% (11)	
Uso de SNG por Íleo Prolongado			
Não	89,6% (43)	52,4% (11)	<0,001 ^c
Sim	10,4% (5)	47,6% (10)	
Reinternação			
Não	97,9% (47)	81% (17)	0,027 ^c
Sim	2,1% (1)	19% (4)	
Reoperação			
Não	100% (48)	28,6% (6)	<0,001 ^c
Sim	0% (0)	71,4% (15)	
UTI			
Não	75% (36)	42,9% (9)	0,014 ^b
Sim	25% (12)	57,1% (12)	
Transfusão			
Não	95,8% (46)	81% (17)	0,065 ^c
Sim	4,2% (2)	19% (4)	
Nutrição Parenteral Total (NPT)			
Não	89,6% (43)	47,6% (10)	<0,001 ^c
Sim	10,4% (5)	52,4% (11)	
Quantitativa			
Tempo de internação			
Média (DP)	5±4 (48)	15±9 (21)	<0,001 ^a
Mediana (min-max)	3 (2-22)	13 (3-35)	

*: não foram encontradas informações para todos os pacientes.

a: Teste Man-Whitney; b: Teste Qui-quadrado de Pearson; c: Teste exato de Fisher; d: Teste exato de Fisher-Freeman-Halton

Tanto a dieta pré-operatória quanto a dieta pós-operatória foram administradas em mais de 90,0% dos pacientes, assim como o uso de suplementação nutricional no período pré-operatório através do uso de imunonutrição ou simbióticos, no entanto, como podemos observar na **Tabela 7**, não encontramos uma associação consistente entre tais variáveis e o desfecho principal.

A única variável que apresentou uma diferença mais expressiva entre os grupos foi a abreviação do jejum no pós-operatório. No grupo caso, 80,0% (n=16) dos pacientes tiveram o período de jejum reduzido após a cirurgia, enquanto no grupo controle essa taxa foi de 52,2% (n=24; p=0,054). Contudo, essa correlação não se manteve quando a análise foi expandida para incluir o GE2-Co (p=0,177).

Tabela 7: Modulação nutricional prévia e pós cirurgia colorretal (GE1).

Variáveis	Fístula		Valor de p
	Não 48 (n)	Sim 21 (n)	
Suplementação nutricional no pré-operatório			
Não	6,3% (3)	9,5% (2)	0,636 ^c
Sim	93,8% (45)	90,5% (19)	
Dieta pré-operatória*			
Não	8,7% (4)	0% (0)	0,306 ^c
Sim	91,3% (42)	100% (20)	
Imunonutrição*			
Não	6,5% (3)	15,0% (3)	0,502 ^c
Sim	93,5% (43)	85,0% (17)	
Simbiótico*			
Não	6,5% (3)	20% (4)	0,186 ^c
Sim	93,5% (43)	80% (16)	
Dieta pós-operatória*			
Não	8,7% (4)	5% (1)	1,000 ^c
Sim	91,3% (42)	95% (19)	
Abreviação do jejum no pós-operatório*			
Não	47,8% (22)	20% (4)	0,054 ^b
Sim	52,2% (24)	80% (16)	

*: não foram encontradas informações para todos os pacientes.

a: Teste Man-Whitney; b: Teste Qui-quadrado de Pearson; c: Teste exato de Fisher; d: Teste exato de Fisher-Freeman-Halton

As informações extraídas dos prontuários foram complementadas por um questionário aplicado a 81 pacientes, abrangendo histórico de saúde, hábitos alimentares e estilo de vida. Os participantes estavam distribuídos entre os grupos caso (n=4), GE1-Co (n=16), GE2-Co (n=6) e GE3-Co (n=55). Infelizmente o pequeno número de casos para os quais as informações foram disponíveis, impacta sensivelmente a validade desta análise. As informações sobre hábitos alimentares foram comparadas para todos os grupos de estudo, na tentativa de ampliar a amostragem. Embora essa abordagem não tenha demonstrado uma associação estatisticamente relevante (**Tabela 8**), e apesar do reduzido N amostral dos casos, observa-se tendência a um menor consumo de cereais ricos fibras entre pacientes que desenvolveram FAs quando comparados aos controles (p=0,051).

Tabela 8: Hábitos alimentares dos 81 indivíduos participantes do estudo (GE3).

Variáveis	Fístula		Valor de p
	Não 77 (n)	Sim 4 (n)	
Doces*			
Sem consumo	7,2% (5)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	92,8% (64)	100% (4)	
Farinha branca*			
Sem consumo	2,8% (2)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	91,2% (70)	100% (4)	
Vegetais amiláceos*			
Sem consumo	5,6% (4)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	94,4% (68)	100% (4)	
Vegetais não amiláceos*			
Sem consumo	1,4% (1)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	98,6% (72)	100% (4)	
Folhas*			
Sem consumo	5,5% (4)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	94,5% (69)	100% (4)	
Frutas*			
Sem consumo	1,4% (1)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	98,6% (72)	100% (4)	
Leguminosas*			
Sem consumo	8,2% (6)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	91,8% (67)	100% (4)	
Cereais ricos em fibras*			
Sem consumo	45,8% (33)	100% (4)	0,051 ^c
Com Consumo	54,2% (39)	0% (0)	
Laticínios*			
Sem consumo	11,1% (8)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	88,9% (64)	100% (4)	
Peixe*			
Sem consumo	19,4% (14)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	80,6% (58)	100% (4)	
Frango*			
Sem consumo	2,8% (2)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	97,2% (69)	100% (4)	
Carne vermelha*			
Sem consumo	8,3% (6)	0% (0)	1,000 ^c
Com Consumo	91,7% (72)	100% (4)	
Carnes processadas*			
Sem consumo	28,2% (20)	0% (0)	0,568 ^c
Com Consumo	71,8% (51)	100% (4)	

*: não foram encontradas informações para todos os pacientes.

a: Teste Man-Whitney; b: Teste Qui-quadrado de Pearson; c: Teste exato de Fisher; d: Teste exato de Fisher-Freeman-Halton

4.2 Caracterização da microbiota por sequenciamento de DNA total

Para permitir uma comparação mais equilibrada entre os grupos, dois pacientes (paciente_15 e paciente_72) do GE1-Co foram realocados para o GE2-Co, uma vez que os respectivos pacientes do grupo caso, com os quais haviam sido pareados, não tiveram

nenhuma amostra coletada. No total, coletamos e sequenciamos 142 amostras, sendo 61 pré-cirúrgicas - provenientes da primeira coleta (caso:12; GE1-Co: 37; GE2-Co: 12) - e 81 da segunda coleta – pós terapia antimicrobiana, coletadas na cirurgia (caso:18; GE1-Co: 45; GE2-Co: 18). Após o processamento das sequências brutas, foi feita a aplicação dos filtros de qualidade e classificação das sequências de DNA individualmente em níveis taxonômicos (usando o programa Kraken2) conforme descrito na seção 3.10.1. No total restaram 2.922.117.013 sequências, com uma mediana de 19.126.907 sequências por amostra (mínimo de 3.579.722 e máximo de 108.988.090). No passo seguinte, fizemos a remoção das sequências que alinharam com DNA humano, que naturalmente espera-se que seja encontrado nas amostras (**Figura 3A**). Após este filtro, restaram 1.941.965.276 sequências, com uma mediana de 14.333.428 sequências por amostra (mínimo de 191.084 e máximo de 108.881.365). A **Tabela 9** indica o número total de sequências geradas por amostra, além da distribuição dos *reads* mapeadas em diferentes domínios taxonômicos.

Tabela 9: Dados genômicos gerais obtidos no sequenciamento shotgun (GE1).

	Caso			Controle			Valor de p
	média	mediana	(%)	média	mediana	(%)	
Reads brutos	21.708.090	17.995.814	---	19.932.369	19.109.534	---	0,577
Humanos	8.464.009	2.350.838	39,0%	6.484.209	1.013.195	32,5%	0,411
Bactéria	6.727.661	5.717.851	31,0%	5.707.654	5.151.513	28,6%	0,351
Vírus	45.650	2.437	0,2%	45.525	3.188	0,2%	0,671
Arquea	43.517	358	0,2%	47.814	761	0,2%	0,753
Fungi	114.842	88	0,5%	5.578	5.578	0,03%	0,201
NA	6.312.409	6.797.233	29,1%	7.641.587	8.135.569	38,3%	0,449

Nota: os valores de p foram calculados utilizando o teste de Wilcoxon, pois os dados não seguem distribuição normal.

A análise dos dados metagenômicos obtidos nas duas coletas revelou diferenças marcantes entre os grupos (**Tabela 10**). No grupo controle, observou-se uma redução estatisticamente significativa nas abundâncias de *reads* associados a bactérias, vírus e sequências não-classificadas. Em contraste, o grupo caso não apresentou reduções significativas nas abundâncias, com exceção da categoria de sequências não-classificadas, apesar das quedas aparentes nas medianas. Esses achados corroboram para a hipótese do grupo caso possuir maior resistência microbiana, potencialmente devido à presença de genes de resistência antimicrobiana, fazendo necessário uma melhor avaliação dessas interações.

Tabela 10: Dados metagenômicos intra-grupos quando separados por momento de coleta (GE2).

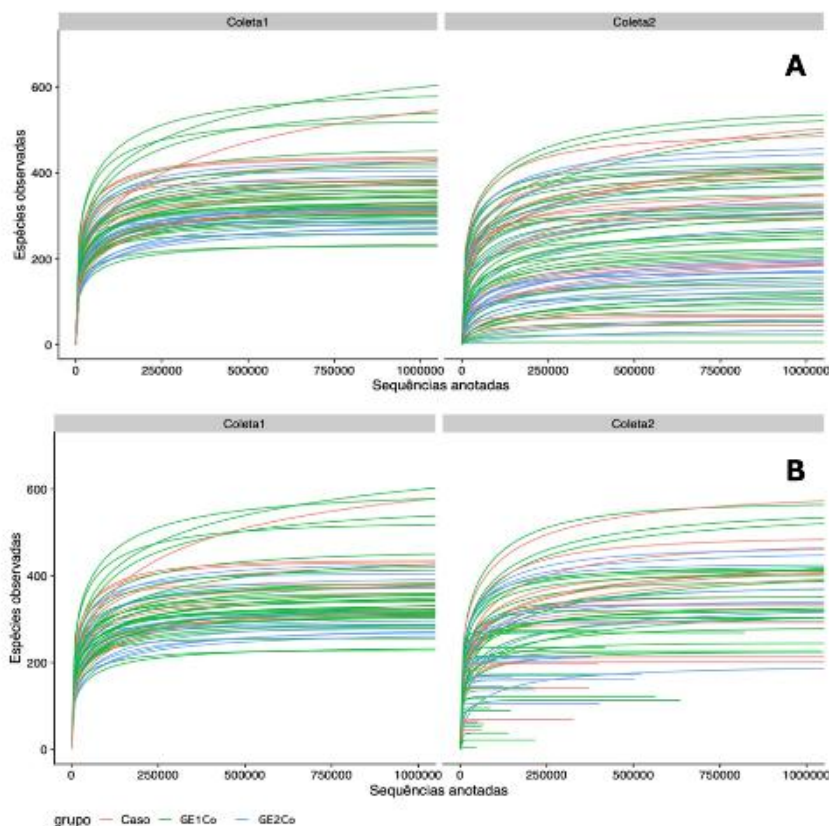
	Caso				
	Coleta 1	(%)	Coleta 2	(%)	Valor de p
Total por amostra	230.055.877	---	23.399.269	---	---
Humanos	56.314	8,6%	13.265.280	55,6%	0,173
Bactéria	5.763.718	44,2%	4.790.584	23,8%	0,249
Vírus	2.653	0,2%	2.170	0,2%	0,602
Arquea	160	0,1%	619	0,3%	0,816
Fungi	104	0,4%	70	0,6%	0,611
NA	8.417.720	46,6%	2.127.909	19,5%	0,005

	Controle				
	Coleta 1		Coleta 2	(%)	Valor de p
Total por amostra	20.317.233	---	19.633.032	---	---
Humanos	65.448	1,9%	12.849.676	57,2%	<0,001
Bactéria	6.786.246	39,2%	1.634.544	20,2%	<0,001
Vírus	8.205	0,3%	1.071	0,2%	<0,001
Arquea	1755	0,3%	452	0,2%	0,274
Fungi	104	0,002%	46	0,1%	0,279
NA	9.828.457	58,3%	751.890	22,3%	<0,001

Nota: valores apresentados correspondem às medianas. Os valores de p foram calculados utilizando o teste de Wilcoxon, pois os dados não seguem distribuição normal.

Estas sequências foram mapeadas nas respectivas espécies bacterianas após refinamento das abundâncias taxonômicas por meio do Bracken (*Bayesian Reestimation of Abundance with Kraken*), uma ferramenta que refina a saída de dados do Kraken2 para reestimar a distribuição das sequências entre diferentes níveis taxonômicos, visando maior acurácia dos dados. Para uma análise inicial plotamos curvas de saturação que avaliam, para diferentes números de sequências, quantas espécies distintas são encontradas. Os dados indicaram que a saturação foi obtida para todas as amostras, ou seja, o número de sequências obtidas foi suficiente para cobrir toda a diversidade presente (**Figura 3A**).

Figura 3: Curvas de saturação das amostras sequenciadas.



Legenda: (A) Curvas de saturação com espécies identificadas. (B) Curvas de saturação após remoção de sequências alinhadas com hospedeiro.

Foram observados diferentes perfis de saturação entre as amostras analisadas nos dois momentos de coleta. No entanto, para todas as amostras de ambos os grupos a saturação foi aparentemente atingida, com mais de 46.580 mil sequências, o que justificou sua inclusão nas análises subsequentes do estudo.

Ao analisar a quantidade de espécies observadas, verificou-se um padrão distinto nas amostras do GE2-Co. Para assegurar a qualidade dos dados, todas as etapas anteriores ao sequenciamento foram cuidadosamente revisadas para identificar possíveis contaminações ou vieses, porém, nenhuma irregularidade ou padrão foi detectado nas doze amostras que apresentaram menos de 100 espécies observadas (Ca: 3 amostras; Ge1-Co: 6 amostras; GE2-Co: 3 amostras), que justificasse sua exclusão.

A heterogeneidade observada pode estar relacionada à variabilidade microbiana interindividual. Ainda, apesar de termos usado os mesmos kits e enzimas, diferenças na eficiência de extração dos ácidos nucleicos, ou ainda a possíveis vieses introduzidos durante a

etapa de amplificação por PCR podem ainda ter interferido de algum modo, pois esses fatores são reconhecidamente fontes potenciais de viés em estudos metagenômicos (Bruggeling *et al.* 2021; Wu, Zhang e Zhou 2021; Nearing, Comeau e Langille 2021).

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA

Nas 142 amostras analisadas observamos 20 filos, 40 classes, 93 ordens, 192 famílias, 554 gêneros e 1607 espécies bacterianas. Quando separamos as amostras por momento de coleta e grupos, notamos que a quantidade de bactérias identificadas nos níveis taxonômicos de classe e família se mantiveram para grupo caso em ambas as coletas, no entanto, no grupo controle esse comportamento não foi reproduzido (**Tabela 11**). A mediana do número de táxons identificados por amostra não apresentou diferença estatisticamente significativa entre casos e controles, no entanto, ao aumentar o número amostral com o GE2-Co, observou-se uma redução nos valores de p, sugerindo uma influência do aumento do tamanho amostral sobre a significância estatística. Desta forma, optamos por seguir as análises com o maior grupo amostral. A partir deste ponto, os dados de grupo controle, se referem ao GE2-Co.

Em todos os níveis taxonômicos foram observadas sequências identificadas como 'NA'. Essa nomenclatura é atribuída pelos bancos de dados para indicar táxons que ainda não foram descritos na literatura ou cuja região sequenciada não apresentou informações suficientes para sua anotação. Cerca de 31.0% táxons foram classificados como desconhecidos, destes, 21,5% estavam no grupo caso e 78,5% no grupo controle. Essas atribuições de 'NA' refletem limitações dos bancos de dados utilizados, pois a identificação taxonômica depende da disponibilidade de sequências de referência previamente catalogadas para a comparação com as sequências obtidas no estudo. Essa limitação destaca a necessidade contínua de expandir e atualizar os bancos de dados genômicos para melhorar a precisão da anotação nas análises metagenômicas.

Tabela 11: Diferentes níveis taxonômicos identificados nas 142 amostras sequenciadas.

Grupo	Coleta	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
Caso	Coleta 1	14	28	60	120	325	925
	Coleta 2	13	28	60	120	310	849
Controle	Coleta 1	18	37	77	162	399	1085
	Coleta 2	16	31	67	136	347	1042

4.2.2 DIVERSIDADE MICROBIANA ALFA E BETA

A diversidade alfa é uma métrica utilizada para avaliar a diversidade microbiana dentro de um grupo, por meio da riqueza e uniformidade, quantificando tanto a riqueza de táxons observados, quanto a uniformidade na sua distribuição. Para essa avaliação, foram utilizados diferentes índices que abordam aspectos específicos da diversidade. O índice *Observed* foi utilizado na avaliação da riqueza, refletindo o número total de táxons observados por amostra, sem considerar a uniformidade na distribuição. Os índices Shannon e Simpson avaliam simultaneamente a riqueza e a uniformidade, porém com ênfases distintas. O índice de Shannon é mais sensível à presença de espécies menos abundantes, identificando pequenas variações na composição da comunidade microbiana, enquanto o índice de Simpson é mais indicado para avaliação de espécies mais abundantes (Lande 1996).

Vale ressaltar na interpretação dos dados de diversidade alfa que embora os valores absolutos de espécies identificadas por grupo indiquem uma maior riqueza taxonômica no grupo controle, o índice *Observed*, reflete a riqueza efetiva baseada em uma matriz de abundância normalizada e tratada estatisticamente, podendo apresentar variações mesmo em amostras com número absoluto semelhante ou superior.

Para avaliar a diversidade, as amostras foram agrupadas de acordo com os dois momentos de coleta, comparando os pacientes que desenvolveram fístula anastomótica com os que não apresentaram este desfecho clínico.

Foram observadas variações nos valores de diversidade entre os grupos caso e controle, ao longo dos diferentes níveis taxonômicos analisados, de filo a espécie, enfatizando a diversidade microbiana entre os grupos. No entanto, quando as amostras foram avaliadas por momento de coleta, notamos que entre os grupos caso e controle no momento da coleta pré antibioticoterapia não houve nenhum resultado significativo, e após a administração do

protocolo antibiótico, apenas os índices de Shannon e Simpson no nível de ordem apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Na comparação intra-grupo, a diversidade microbiana dos pacientes que desenvolveram FA mostrou-se pouco alterada após a antibioticoterapia profilática com metronidazol e neomicina. Por outro lado, no grupo controle, observaram-se alterações significativas em todos os níveis taxonômicos analisados (Tabela 12).

Tabela 12: Valores de p encontrados na diversidade alfa através do teste Wilcoxon (GE2).

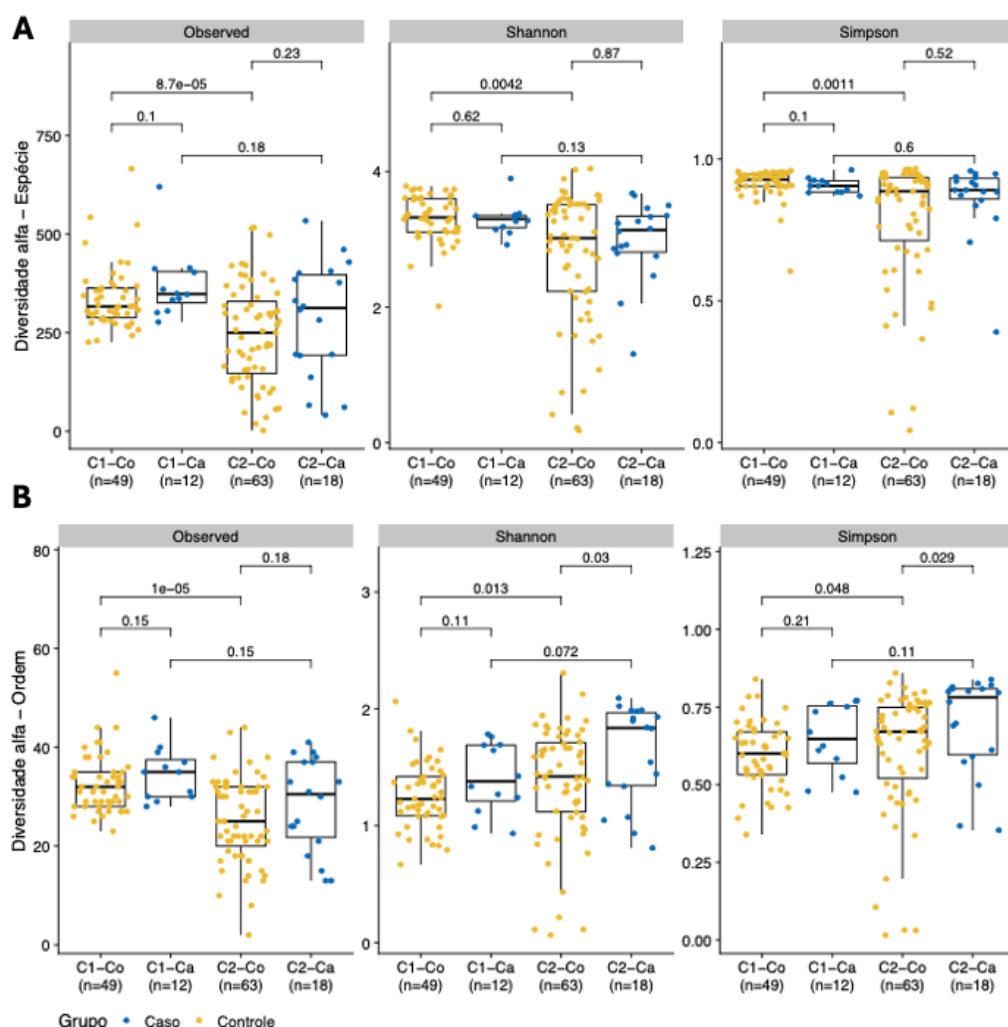
		C1-Ca X C1-Co	C2-Ca X C2-Co	C1-Ca X C2-Ca	C1-Co X C2-Co
Espécie	Observed	0,100	0,230	0,180	<0,001
	Shannon	0,620	0,870	0,130	0,004
	Simpson	0,100	0,520	0,600	0,001
Gênero	Observed	0,150	0,210	0,190	<0,001
	Shannon	0,980	0,570	0,550	0,044
	Simpson	0,690	0,460	0,950	0,047
Família	Observed	0,280	0,240	0,170	<0,001
	Shannon	0,730	0,150	0,660	0,320
	Simpson	0,770	0,130	0,390	0,360
Ordem	Observed	0,150	0,180	0,150	<0,001
	Shannon	0,110	0,030	0,072	0,013
	Simpson	0,210	0,029	0,110	0,048
Classe	Observed	0,210	0,290	0,016	<0,001
	Shannon	0,110	0,110	0,220	0,160
	Simpson	0,210	0,085	0,350	0,270
Filo	Observed	0,480	0,097	0,089	<0,001
	Shannon	0,250	0,210	0,950	0,390
	Simpson	0,360	0,260	0,660	0,091

C1-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 1; C1-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 1; C2-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 2; C2-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 2.

Para os indivíduos do grupo controle, a nível de espécie, observamos de modo consistente uma diversidade bacteriana significativamente maior no momento de coleta 1 se comparado ao momento de coleta 2, para todos os três índices analisados (*Observed* e Simpson, $p < 0,001$; Shannon, $p < 0,05$) (**Figura 4A**), indicando um maior número de bactérias por amostra e uma distribuição mais equilibrada dentro do grupo, refletindo uma maior diversidade tanto de espécies abundantes quanto raras. Essa característica se manteve no índice *Observed* para os todos os níveis taxonômicos e para os índices Shannon e Simpson nos níveis gênero e ordem. A nível de ordem, também foi observada uma diferença significativa

entre casos e controles no momento da segunda coleta, sugerindo que os pacientes que viriam a desenvolver FA já apresentavam uma maior diversidade bacteriana no momento da cirurgia (**Figura 4B**). No nível de classe, dentro do grupo caso, o índice *Observed* também mostrou diferença estatisticamente significativa. A diversidade alfa entre casos e controles no momento da coleta 1 não apresentou relevância estatística em nenhum nível taxonômico.

Figura 4: Análise comparativa da diversidade alfa entre casos e controles (GE2).



Legenda: A: Diversidade alfa a nível taxonômico de espécie; B: Diversidade alfa a nível taxonômico de ordem. C1-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 1; C1-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 1; C2-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 2; C2-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 2. O teste não paramétrico U de Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test) foi utilizado para verificar a existência de diferença com significado estatístico entre os grupos quando $p \leq 0,05$.

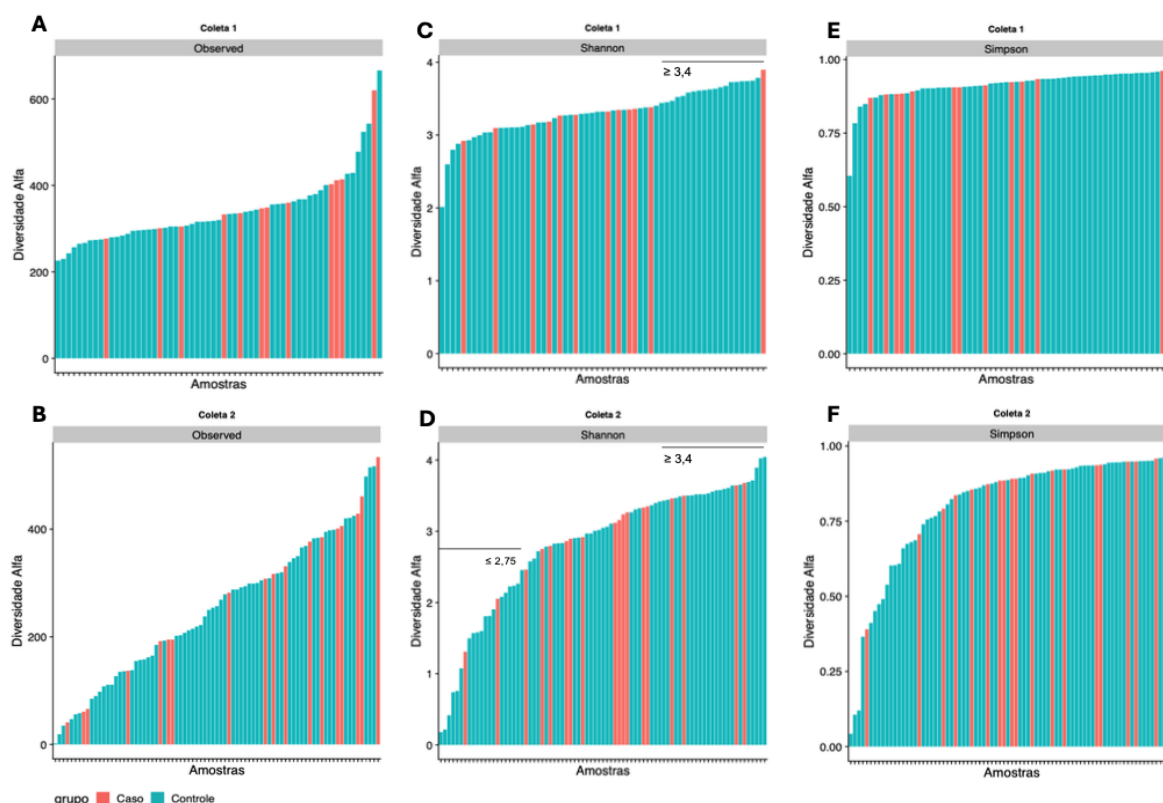
Nenhum paciente apresentou diversidade alfa inferior a 200 espécies na coleta 1 e mais de 90,0% dos pacientes estavam no intervalo de 200 e 450 espécies (**Figura 5A**). Por outro lado, na coleta 2 houve uma queda na diversidade, com 61,7% (n=50) dos indivíduos

apresentando menos de 300 espécies, dos quais 86,0% (n=43) dos indivíduos era composto pelo grupo controle e apenas 14,0% (n=7) composto pelo grupo caso (**Figura 5B**).

Um maior equilíbrio entre riqueza e uniformidade de bactérias menos abundantes foi observado em 34,4% dos indivíduos no momento da coleta 1, onde 40,8% (n=20) do grupo controle foi representada na faixa acima de 3,4 no índice Shannon, enquanto apenas uma amostra do grupo caso também estava nesta faixa (8,3%) (**Figura 5C**). Já na coleta 2, a redução da diversidade foi mais equilibrada entre os grupos, embora o grupo controle tenha apresentado 71,4% dos pacientes com diversidade abaixo de 2,75 ou acima de 3,4, enquanto o grupo caso teve 61,1% dos pacientes na faixa intermediária (entre 2,75 e 3,4) (**Figura 5D**). O equilíbrio entre riqueza e uniformidade de bactérias mais abundantes (Simpson) foi semelhante ao observado no índice Shannon (**Figura 5E e 5F**).

Esses resultados sugerem que a antibioticoterapia profilática foi mais efetiva no grupo controle, pois este parece ter sofrido uma depleção bacteriana mais acentuada de forma geral, enquanto a riqueza e uniformidade de bactérias mais e menos abundantes, apresentaram-se de forma polarizada, sugerindo que algumas espécies foram efetivamente impactadas. Em contrapartida, o grupo caso apresentou um perfil mais estável, com menor variação na composição microbiana, sugerindo uma inefetividade da terapia antimicrobiana. Esses resultados sugerem que a menor eficiência do antibiótico profilático impacta a diversidade da microbiota intestinal, o que se reflete no surgimento das FAs no momento pós-operatório.

Figura 5: Análise de diversidade alfa a nível de espécies, para casos e controles do GE2.



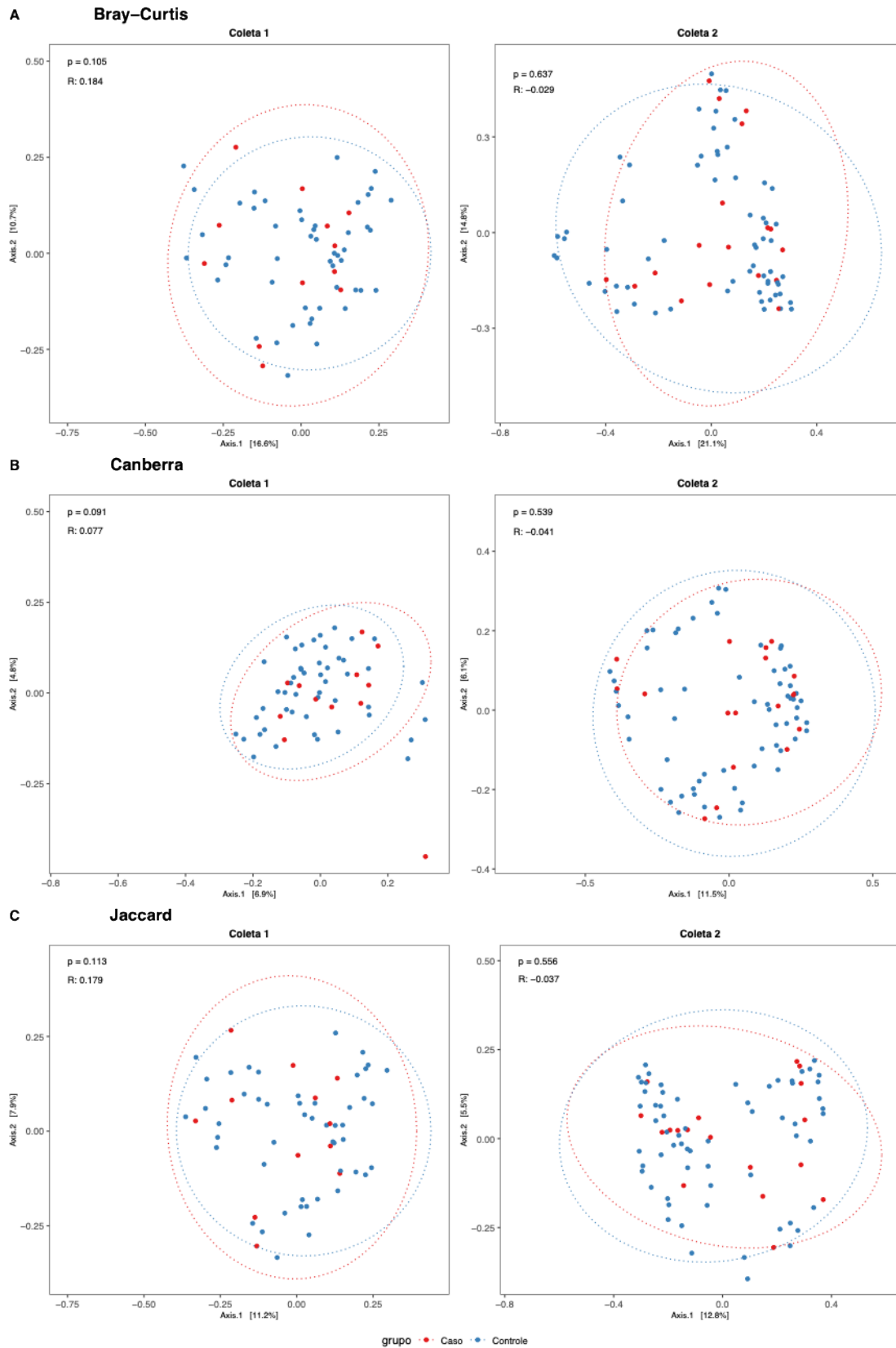
Legenda: Os gráficos no painel superior indicam a coleta 1, enquanto os gráficos no painel inferior se referem à coleta 2. Os índices usados foram *Observed* (painéis **A** e **B**); Índice Shannon (painéis **C** e **D**) e índice de Simpson (painéis **E** e **F**). A diversidade dos casos é apontada pelas barras laranja e a dos controles é apontada pelas barras verdes.

Os grupos também foram avaliados quanto a diversidade beta, que avalia as diferenças quantitativas e qualitativas entre as comunidades bacterianas. Foram utilizados os índices Bray-Curtis e Canberra, que avaliam a dissimilaridade quantitativa, levando em conta a abundância relativa dos táxons presentes, sendo o índice Canberra mais sensível a táxons raros, o que pode ser crucial para detectar alterações mais sutis em espécies microbianas de baixa abundância, e o índice Jaccard, que avalia a dissimilaridade qualitativa, considerando apenas a presença/ausência de bactérias, independentemente da quantidade (Bray e Curtis 1957; Magurran 2004; Lance e Williams 1967). A visualização dos índices foi feita por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e Escalonamento Multidimensional (MDS).

Na análise de diversidade beta não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos a nível de espécie, somente uma discreta tendência, ainda que não significativa, na diferença da composição microbiana, utilizando o índice Canberra, entre os grupos na coleta 1 ($p=0,091$) (**Figura 6B**). Essa tendência se manteve ao longo dos níveis taxonômicos

superiores, tornando-se estatisticamente significativa no nível de classe ($p \leq 0,05$). Esses achados sugerem que a abundância e composição geral dos grupos sejam semelhantes, com sutis variações em níveis taxonômicos mais amplos.

Figura 6: Diversidade beta entre casos e controles do GE2.



Legenda: os índices usados foram: **A:** Bray-Curtis; **B:** Canberra; **C:** Jaccard. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras, e PERMANOVA para coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

A profilaxia combinada de neomicina e metronidazol provocou queda acentuada da diversidade alfa no grupo controle, significativa em todos os níveis taxonômicos pelo índice *Observed* (de espécie a filo) e pelos índices de riqueza-uniformidade (Shannon, Simpson) nos níveis de espécie, gênero e ordem (**Tabela 12**). Nos pacientes que desenvolveram fístula, os mesmos índices permaneceram estáveis, confirmando a tendência de resistência bacteriana já sugerida pela ausência de redução substancial de “*reads* bacterianos” totais (**Tabela 10**). Antes da profilaxia antibiótica, casos e controles exibiam diversidade comparável e após a profilaxia a única diferença inter-grupos surgiu a nível de ordem (Shannon/Simpson, $p \approx 0,03$), com os casos mantendo uma maior heterogeneidade.

A diversidade beta demonstrou que os dois grupos compartilham a maior parte das espécies comuns, mas divergem em certos microrganismos menos abundantes, sendo que esta discrepância já era precedente a profilaxia antibiótica, uma vez que Bray–Curtis e Jaccard não distinguiram claramente os grupos, mas o índice Canberra (sensível a táxons raros) indicou esta tendência na coleta 1 ($p=0,091$) (**Figura 6B**). A ponderação extra do índice Canberra tornou essa sutil diferença detectável, sugerindo que pequenos componentes da microbiota, embora raros, podem ter papel desproporcional na evolução clínica.

Os achados sobre a diversidade alfa e beta no contexto do desenvolvimento de fístula ainda são inconclusivos. Enquanto alguns trabalhos identificam diferenças significativas entre indivíduos com e sem fístula, outros não demonstram alterações expressivas utilizando essas métricas. Essa inconsistência pode estar relacionada a diferenças nos delineamentos experimentais, como o tipo de amostra utilizada, critérios clínicos adotados ou abordagens analíticas empregadas. Ainda assim, observa-se que a diversidade alfa tende a estar reduzida em pacientes com fístula anastomótica, e a diversidade beta frequentemente revela táxons específicos que surgem como possíveis biomarcadores, mesmo quando as diferenças globais não atingem significância estatística.

Sabendo que a diversidade microbiana no intestino pode variar de acordo com a região de localização do tumor, também foi avaliada a diversidade alfa e beta agrupando as amostras nas seguintes localizações: cólon direito, cólon esquerdo e reto.

A diversidade alfa manteve similaridade em todas as localizações no índice *Observed* para o grupo controle entre os momentos de coleta, conforme observado anteriormente ($p < 0,05$). Nos índices Shannon e Simpson, houve uma melhor discriminação, onde somente o

cólon esquerdo apresentou significância ($p=0,015$ e $p < 0,008$, respectivamente). Nos níveis taxonômicos superiores também foram mantidos resultados significativos de diversidade no índice *Observed* para ordem, classe e filo, no entanto, quanto separado por localização, os níveis de gênero e família também passaram a ser significativos entre os momentos de coleta no grupo controle. Uma tendência neste mesmo grupo foi observada no índice Shannon para o cólon direito ($p=0,095$) ao nível de classe, e esta especificidade aumenta a nível de ordem, tornando-se significativa nos índices Shannon e Simpson (respectivamente $p=0,009$ e $p=0,034$). No cólon esquerdo foi observada uma tendência a significância estatística no índice *Observed* para os indivíduos dos grupos caso e controle durante a coleta 1 (filó: $p=0,056$; ordem: $p=0,055$), que se mostrou significativa a nível de classe ($p = 0,054$). Para reto, observamos uma tendência apenas a nível de filo (Shannon: $p=0,091$) para os grupos caso e controle durante a coleta 1, e na coleta 2 os índices Shannon e Simpson se mostraram levemente significativos nos níveis classe e ordem ($p=0,054$).

Diferenças significativas na diversidade beta também foram identificadas a nível de espécie no cólon direito no momento da coleta 1, tanto pelo índice Bray-Curtis ($p=0,033$; $r=0,419$), que leva em consideração a abundância relativa dos táxons, quanto pelo índice Jaccard ($p=0,027$; $r=0,421$), que avalia apenas a presença ou ausência de espécies bacterianas. No reto, foi observada uma variação significativa no momento da coleta 2, pelo índice Canberra a nível classe ($p=0,036$; $r=0,024$), evidenciando uma maior abundância de táxons raros.

Os resultados da diversidade alfa evidenciam que a localização anatômica influencia na composição bacteriana. No cólon direito, os pacientes do grupo controle apresentaram maior riqueza tanto de baixa, quanto de alta abundância para diferentes táxons a nível de ordem, apresentando um aumento na diversidade dessas bactérias após o tratamento antibiótico. No cólon esquerdo, observou-se uma maior diversidade geral no grupo controle em ambos os momentos de coleta, enquanto no grupo caso foi identificada apenas uma tendência de maior diversidade na coleta 1, sem alterações relevantes na coleta 2. Já no reto, o grupo caso apresentou uma diversidade mais elevada apenas de bactérias menos abundantes na coleta 1, mantendo esse padrão na coleta 2, indicando que está não foi afetada pelo uso de antibióticos. Por outro lado, os resultados da diversidade beta foram mais sutis, sugerindo que as abundâncias e distâncias filogenéticas entre as bactérias sejam semelhantes entre os grupos de forma geral.

Contudo, é importante destacar que após a estratificação das amostras por localização, o número de indivíduos foi consideravelmente reduzido, especialmente no grupo caso, o que compromete a robustez das análises estatísticas e limita a confiabilidade dos resultados. Diante dessa limitação, optamos por seguir com as análises considerando apenas a divisão entre os grupos caso e controle.

4.2.3 COMPOSIÇÃO BACTERIANA ENTRE CASOS E CONTROLES

Na análise da abundância relativa dos táxons presentes nas 142 amostras, observamos que um conjunto restrito de táxons domina a composição microbiana (**Tabela 13**). Quando se consideram apenas os táxons com abundância superior a 10%, observa-se que nos níveis inferiores poucas espécies se destacam, enquanto nos níveis taxonômicos superiores, a microbiota foi dominada por poucos grupos.

Tabela 13: Distribuição dos táxons por nível taxonômico e faixas de abundância relativa (GE2).

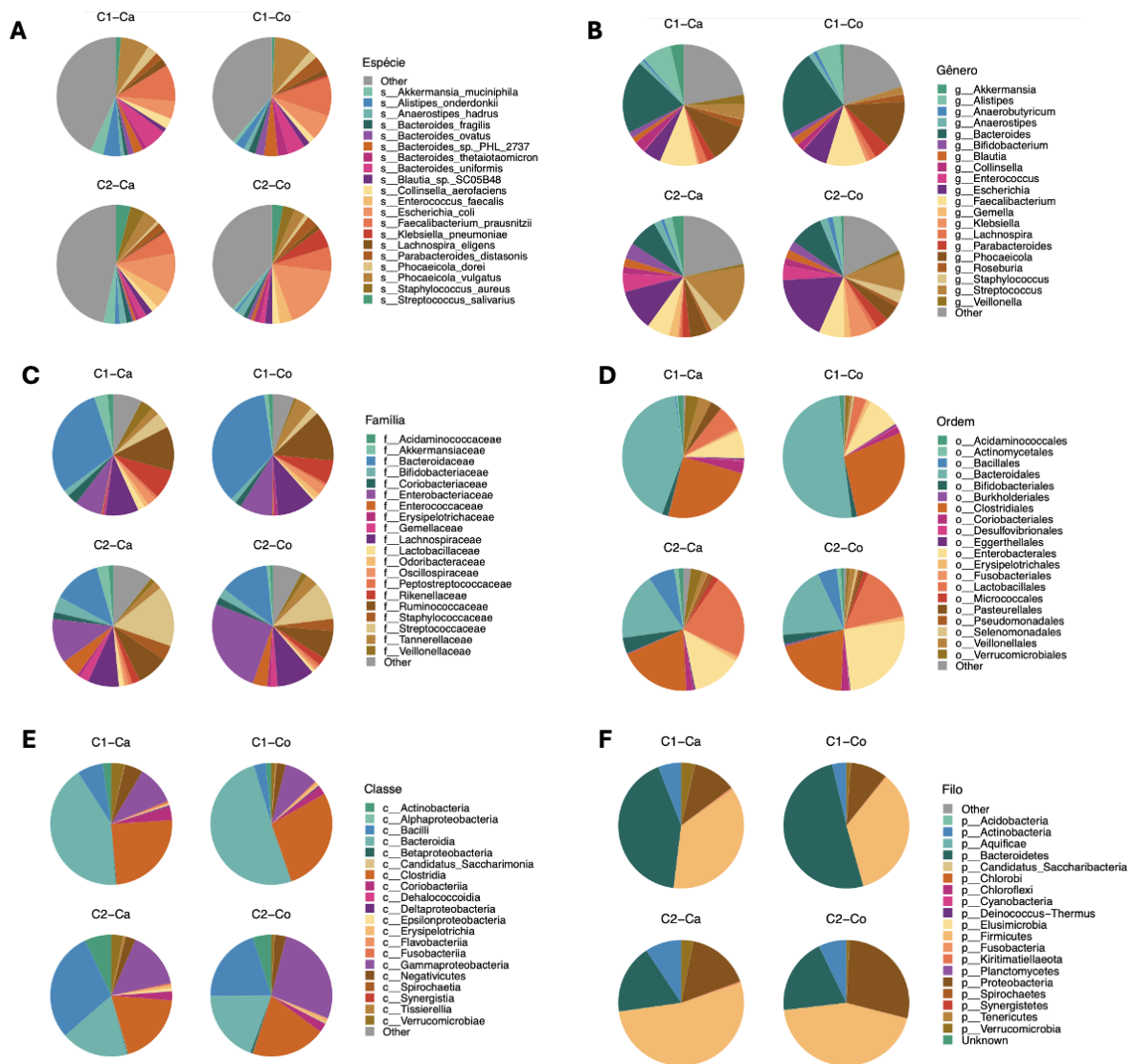
Nível Taxonômico	total	<1%	>1%	>10%
Espécie	1607	1589	17	1
Gênero	554	539	13	2
Família	192	178	12	2
Ordem	93	82	8	3
Classe	40	29	7	4
Filo	20	13	4	3

Na coleta pré-antibioticoterapia, em nível de espécie, apenas *Phocaeicola vulgatus* ultrapassou o limiar de 10% de abundância relativa, sendo detectada exclusivamente no grupo controle e presente em todas as amostras do GE1. Entre os casos, nenhuma espécie isolada atingiu esse valor. Já no nível de gênero, o táxon *Bacteroides* superou 10% no grupo caso, enquanto no grupo controle ficou acima dos 20%, seguido de *Phocaeicola* na faixa dos 10%. Em nível de família, ambos os grupos apresentaram comportamento semelhante, com predomínio de *Ruminococcaceae* e *Bacteroidaceae*. A partir do nível de ordem, *Bacteroidales* se destacaram, superando 50% no grupo controle e esse padrão se manteve ao longo de classe e filo. Na coleta após antibioticoterapia, observou-se uma redução na quantidade de táxons

com alta abundância relativa, especialmente nos níveis taxonômicos inferiores. As abundâncias ficaram abaixo dos 20%, com exceção apenas do filo *Firmicutes* que apresentou abundância acima dos 40% em ambos os grupos. A partir do nível de ordem, começam a surgir táxons mais representativos, *Bacteroidales* aparece em ambos os grupos com abundância superior a 10%, enquanto *Lactobacillales* e *Clostridiales* se destacam entre os casos. A nível de classe, *Bacilli* foi exclusivo entre casos e *Gammaproteobacteria* exclusiva entre controles, enquanto a distribuição de *Bacteroidia* e *Clostridia*, foram similares nos grupos, ficam na faixa dos 10% e 20%. Embora as abundâncias relativas entre os grupos tenham apresentado variações, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para esses táxons.

Na **Figura 7**, foram selecionadas as médias dos 20 táxons mais abundantes em cada grupo, considerando o momento da coleta. Pudemos então observar de forma mais clara como esta distribuição ocorre a cada nível taxonômico, e evidencia que, embora os grupos compartilhem padrões semelhantes de composição microbiana, a abundância relativa dos táxons apresenta variações distintas entre eles.

Figura 7: Distribuição de táxons classificados por abundância relativa em diferentes níveis taxonômicos do GE2.



Legenda: Os táxons estão divididos nos níveis taxonômicos: A: espécie; B: gênero; C: família; D: ordem; E: classe; F: filo. C1-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 1; C1-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 1; C2-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 2; C2-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 2. Os valores estão expressos em média.

Ao comparar a abundância relativa de alguns táxons, observamos uma discrepância entre as métricas de tendência central, média e mediana. Essa diferença reflete a natureza assimétrica dos dados metagenômicos, sendo a média influenciada por indivíduos, mesmo que poucos, com abundância elevada ou reduzida. Dessa forma, optamos pelo uso da mediana nas análises subsequentes, por se tratar de uma métrica mais robusta para representar a tendência central da comunidade microbiana em conjuntos de dados assimétricos.

Para melhor caracterizar as diferenças na composição microbiana entre os grupos, selecionamos táxons com abundância relativa acima de 1% e apresentamos duas tabelas contendo os 10 táxons mais abundantes em cada grupo, quando disponíveis. A análise considerou separadamente a coleta 1 (**Tabela 14**) e a coleta 2 (**Tabela 15**), permitindo uma comparação mais detalhada das possíveis variações na dominância microbiana ao longo do tempo.

Tabela 14: Os 10 táxons mais frequentes (acima de 1%), a nível taxonômico na coleta anterior a antibioticoterapia (GE2).

Caso			Controle		
Espécies			Espécies		
1º	<i>Faecalibacterium_prausnitzii</i>	0,0866	1º	<i>Phocaeicola_vulgatus</i>	0,1004
2º	<i>Phocaeicola_vulgatus</i>	0,0747	2º	<i>Faecalibacterium_prausnitzii</i>	0,0873
3º	<i>Bacteroides_uniformis</i>	0,0342	3º	<i>Bacteroides_uniformis</i>	0,0373
4º	<i>Parabacteroides_distasonis</i>	0,0186	4º	<i>Parabacteroides_distasonis</i>	0,0256
5º	<i>Bacteroides_thetaiotaomicron</i>	0,0135	5º	<i>Bacteroides_sp._PHL_2737</i>	0,0232
6º	<i>Lachnospira_eligens</i>	0,0125	6º	<i>Bacteroides_thetaiotaomicron</i>	0,0228
7º	<i>Alistipes_shahii</i>	0,0116	7º	<i>Escherichia_coli</i>	0,0218
8º	<i>Blautia_sp.</i>	0,0102	8º	<i>Phocaeicola_dorei</i>	0,0158
9º	<i>Anaerostipes_hadrus</i>	0,0102	9º	<i>Bacteroides_ovatus</i>	0,0142
10º	<i>Bacteroides_fragilis</i>	0,0101	10º	<i>Blautia_sp.</i>	0,0129
Gênero			Gênero		
1º	<i>Bacteroides</i>	0,1647	1º	<i>Bacteroides</i>	0,2207
2º	<i>Phocaeicola</i>	0,0964	2º	<i>Phocaeicola</i>	0,1181
3º	<i>Faecalibacterium</i>	0,0866	3º	<i>Faecalibacterium</i>	0,0873
4º	<i>Alistipes</i>	0,0393	4º	<i>Alistipes</i>	0,0463
5º	<i>Parabacteroides</i>	0,0222	5º	<i>Parabacteroides</i>	0,0296
6º	<i>Blautia</i>	0,0128	6º	<i>Escherichia</i>	0,0220
7º	<i>Lachnospira</i>	0,0125	7º	<i>Roseburia</i>	0,0183
8º	<i>Roseburia</i>	0,0116	8º	<i>Blautia</i>	0,0169
9º	<i>Bifidobacterium</i>	0,0116	9º	<i>Collinsella</i>	0,0108
10º	<i>Streptococcus</i>	0,0106			
Família			Família		
1º	<i>Bacteroidaceae</i>	0,3098	1º	<i>Bacteroidaceae</i>	0,3485
2º	<i>Ruminococcaceae</i>	0,1069	2º	<i>Ruminococcaceae</i>	0,1034
3º	<i>Lachnospiraceae</i>	0,0794	3º	<i>Lachnospiraceae</i>	0,0961
4º	<i>Rikenellaceae</i>	0,0393	4º	<i>Rikenellaceae</i>	0,0463
5º	<i>Tannerellaceae</i>	0,0222	5º	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,0325
6º	<i>Oscillospiraceae</i>	0,0193	6º	<i>Tannerellaceae</i>	0,0297
7º	<i>Streptococcaceae</i>	0,0137	7º	<i>Oscillospiraceae</i>	0,0213
8º	<i>Acidaminococcaceae</i>	0,0134	8º	<i>Odoribacteraceae</i>	0,0112
9º	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,0131	9º	<i>Coriobacteriaceae</i>	0,0108
10º	<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,0116			
Ordem			Ordem		
1º	<i>Bacteroidales</i>	0,4774	1º	<i>Bacteroidales</i>	0,5292
2º	<i>Clostridiales</i>	0,2323	2º	<i>Clostridiales</i>	0,2566
3º	<i>Lactobacillales</i>	0,0397	3º	<i>Enterobacterales</i>	0,0329
4º	<i>Acidaminococcales</i>	0,0134	4º	<i>Lactobacillales</i>	0,0146
5º	<i>Enterobacterales</i>	0,0131	5º	<i>Coriobacteriales</i>	0,0113
6º	<i>Bifidobacteriales</i>	0,0116			
Classe			Classe		
1º	<i>Bacteroidia</i>	0,4774	1º	<i>Bacteroidia</i>	0,5292
2º	<i>Clostridia</i>	0,2323	2º	<i>Clostridia</i>	0,2566
3º	<i>Bacilli</i>	0,0415	3º	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,0414
4º	<i>Negativicutes</i>	0,0293	4º	<i>Bacilli</i>	0,0151
5º	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,0198	5º	<i>Negativicutes</i>	0,0151
6º	<i>Actinobacteria</i>	0,0145	6º	<i>Coriobacteriia</i>	0,0146
7º	<i>Coriobacteriia</i>	0,0121			
Filo			Filo		
1º	<i>Bacteroidetes</i>	0,4774	1º	<i>Bacteroidetes</i>	0,5292
2º	<i>Firmicutes</i>	0,3389	2º	<i>Firmicutes</i>	0,3364
3º	<i>Proteobacteria</i>	0,0322	3º	<i>Proteobacteria</i>	0,0472
4º	<i>Actinobacteria</i>	0,0295	4º	<i>Actinobacteria</i>	0,0235

Tabela 15: Os 10 táxons mais frequentes (acima de 1%) a nível taxonômico na coleta posterior a antibioticoterapia (GE2).

Caso			Controle		
Espécies			Espécies		
1º	Faecalibacterium_prausnitzii	0,0651	1º	Faecalibacterium_prausnitzii	0,0400
2º	Escherichia_coli	0,0195	2º	Escherichia_coli	0,0380
3º	Phocaeicola_vulgatus	0,0158	3º	Parabacteroides_distasonis	0,0140
4º	Anaerostipes_hadrus	0,0138			
5º	Bacteroides_uniformis	0,0125			
6º	Blautia_sp.	0,0114			
7º	Collinsella_aerofaciens	0,0103			
Gênero			Gênero		
1º	Faecalibacterium	0,0651	1º	Bacteroides	0,0482
2º	Bacteroides	0,0610	2º	Streptococcus	0,0432
3º	Streptococcus	0,0465	3º	Faecalibacterium	0,0400
4º	Escherichia	0,0196	4º	Escherichia	0,0380
5º	Phocaeicola	0,0193	5º	Phocaeicola	0,0182
6º	Anaerostipes	0,0139	6º	Parabacteroides	0,0160
7º	Blautia	0,0122	7º	Bifidobacterium	0,0110
8º	Alistipes	0,0114	8º	Alistipes	0,0110
9º	Collinsella	0,0103			
Família			Família		
1º	Bacteroidaceae	0,0857	1º	Enterobacteriaceae	0,0798
2º	Lachnospiraceae	0,0814	2º	Bacteroidaceae	0,0763
3º	Ruminococcaceae	0,0750	3º	Ruminococcaceae	0,0567
4º	Streptococcaceae	0,0475	4º	Lachnospiraceae	0,0566
5º	Enterobacteriaceae	0,0296	5º	Streptococcaceae	0,0446
6º	Rikenellaceae	0,0114	6º	Tannerellaceae	0,0160
7º	Coriobacteriaceae	0,0103	7º	Bifidobacteriaceae	0,0110
			8º	Rikenellaceae	0,0110
Ordem			Ordem		
1º	Clostridiales	0,2001	1º	Clostridiales	0,1672
2º	Bacteroidales	0,1334	2º	Bacteroidales	0,1132
3º	Lactobacillales	0,1162	3º	Enterobacterales	0,0798
4º	Enterobacterales	0,0495	4º	Lactobacillales	0,0578
5º	Coriobacteriales	0,0110	5º	Bifidobacteriales	0,0110
6º	Bacillales	0,0108			
Classe			Classe		
1º	Clostridia	0,2001	1º	Clostridia	0,1672
2º	Bacilli	0,1379	2º	Bacteroidia	0,1132
3º	Bacteroidia	0,1334	3º	Gammaproteobacteria	0,1016
4º	Gammaproteobacteria	0,0517	4º	Bacilli	0,0878
5º	Actinobacteria	0,0238	5º	Actinobacteria	0,0283
6º	Negativicutes	0,0227	6º	Negativicutes	0,0112
7º	Coriobacteriia	0,0174			
Filo			Filo		
1º	Firmicutes	0,4625	1º	Firmicutes	0,4092
2º	Bacteroidetes	0,1335	2º	Bacteroidetes	0,1196
3º	Proteobacteria	0,0589	3º	Proteobacteria	0,1069
4º	Actinobacteria	0,0566	4º	Actinobacteria	0,0472

Ao compararmos estatisticamente as frequências relativas entre os níveis taxonômicos nos dois grupos, observamos a nível de espécie, durante a coleta 1, houve uma distinção de aproximadamente 60% entre os grupos. O grupo controle apresentou espécies exclusivas, como *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides sp._PHL_2737*, *Escherichia coli* e *Phocaeicola dorei*, enquanto o grupo caso foi caracterizado por espécies como *Alistipes shahii*, *Anaerostipes hadrus*, *Bacteroides fragilis* e *Lachnospira eligens*. Apesar das diferenças nas espécies predominantes entre os grupos, essas variações não foram estatisticamente significativas quanto à abundância relativa. No momento da segunda coleta, após antibiótico terapia, a distinção entre os grupos ficou mais evidente ao nível de espécie. No grupo controle, apenas três táxons foram identificados com frequência acima de 1%: *Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Parabacteroides distasonis*. Entre os casos, embora *Escherichia coli* e *Faecalibacterium prausnitzii* também estivessem presentes, o perfil incluiu outras cinco espécies com frequências distribuídas de forma mais heterogênea.

A presença de *Bacteroides fragilis* entre os casos chama atenção por esta ser uma espécie associada à manutenção da integridade da barreira epitelial (Reunanen *et al.* 2015), no entanto, cerca de 90% das cepas dessa espécie são sensíveis ao metronidazol (informação que consta na bula do medicamento), o que sugere a ocorrência de mecanismos de resistência no grupo analisado. A espécie *Alistipes shahii* também chama atenção, considerando que o gênero *Alistipes* foi recentemente relacionado ao desenvolvimento de fístula anastomótica (Hajjar *et al.* 2023). Por outro lado, os táxons *Phocaeicola* e *Faecalibacterium prausnitzii* foram identificados em pacientes com câncer colorretal que não desenvolveram esse desfecho (Lehr *et al.* 2024).

Na **Tabela 16** listamos os táxons onde observamos abundância relativa significativamente diferente entre os grupos.

Tabela 16: Tabela 15: Táxons com diferenças de abundância relativa estatisticamente significativas (teste de Wilcoxon) (GE2).

<i>Superior à 1%</i>				
Coleta 1	Táxon	Caso	Controle	Valor de p
Espécie	<i>Bacteroides_thetaiotaomicron</i>	0,0135	0,0228	0,014
Classe	<i>Actinobacteria</i>	0,0145	0,0058	0,036
	<i>Negativicutes</i>	0,0293	0,0151	0,046
Coleta 2	Táxon	Caso	Controle	Valor de p
Família	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,0296	0,0798	0,040
Classe	<i>Negativicutes</i>	0,0227	0,0112	0,027
<i>Entre 0,1% e 1%</i>				
Coleta 1	Táxon	Caso	Controle	Valor de p
Gênero	<i>Romboutsia</i>	0,0014	0,0003	0,030
Família	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,0040	0,0064	0,016
Ordem	<i>Bacillales</i>	0,0015	0,0003	0,022
	<i>Erysipelotrichales</i>	0,0040	0,0064	0,016
Coleta 2	Táxon	Caso	Controle	Valor de p
Gênero	<i>Phascolarctobacterium</i>	0,0041	0,0005	0,019
Família	<i>Acidaminococcaceae</i>	0,0063	0,0012	0,003
Ordem	<i>Acidaminococcales</i>	0,0063	0,0012	0,003
<i>Entre 0,01% e 0,1%</i>				
Coleta 1	Táxon	Caso	Controle	Valor de p
Espécie	<i>Staphylococcus_aureus</i>	0,00080	0,00012	0,017
	<i>Gemella_sanguinis</i>	0,00013	0,00004	0,042
	<i>Eubacterium_limosum</i>	0,00007	0,00016	0,014
	<i>Monoglobus_pectinilyticus</i>	0,00006	0,00010	0,044
	<i>Hungatella_hathewayi</i>	0,00004	0,00009	0,012
	<i>Gordonibacter_urolithinfaciens</i>	0,00001	0,00006	0,025
	<i>Gordonibacter</i>	0,00012	0,00025	0,040
Gênero	<i>Monoglobus</i>	0,00006	0,00010	0,044
	<i>Staphylococcus</i>	0,00080	0,00013	0,020
Família	<i>Monoglobaceae</i>	0,00006	0,00010	0,044
	<i>Staphylococcaceae</i>	0,00080	0,00013	0,014
Coleta 2	Táxon	Caso	Controle	Valor de p
Espécie	<i>Parvimonas_micra</i>	0,00039	0,00005	0,023
Gênero	<i>Parvimonas</i>	0,00039	0,00005	0,023
Família	<i>Peptoniphilaceae</i>	0,00042	0,00009	0,008
Ordem	<i>Tissierellales</i>	0,00042	0,00009	0,008
Classe	<i>Tissierellia</i>	0,00042	0,00009	0,008

Nos táxons com abundância acima de 1% observamos que conforme elevação do nível taxonômico, a distinção entre os grupos tornou-se progressivamente menos evidente. A nível de filo, ambos os grupos apresentaram os mesmos táxons e, na coleta 1, inclusive na mesma ordem de prevalência. Ainda nesta coleta, a espécie *Bacteroides thetaiotaomicron* esteve presente em ambos os grupos, porém com maior abundância no grupo controle ($p=0,014$), em consonância com achados prévios que mostrou associação desta espécie a processos de cicatrização por diferentes mecanismos fisiológicos (Hooper *et al.* 2003; Stappenbeck *et al.* 2002). A nível de classe, tanto *Actinobacteria* quanto *Negativicutes*, foram significativamente mais abundantes no grupo caso ($p=0,036$ e $p=0,046$, respectivamente).

Na coleta 2, o grupo que desenvolveu FA, apresentou abundância entre *Proteobacteria* e *Actinobacteria* similar, enquanto no controle *Proteobacteria* se destacou, representando mais de 50% da composição relativa entre essas classes. A família *Enterobacteriaceae*, embora presente em ambos os grupos, apresentou uma diferença estatisticamente significativa na abundância relativa, sendo mais prevalente entre os controles ($p=0,040$). Já a classe *Negativicutes* permaneceu com maior prevalência entre os casos ($p=0,027$), possivelmente devido ao aumento dos táxons com frequência relativa inferior a 0,1%, do gênero *Phascolarctobacterium* ($p=0,019$) e da família *Acidaminococcaceae* ($p=0,003$). Embora *Negativicutes* não tenha sido previamente associada ao desenvolvimento de FA, esse achado sugere um potencial envolvimento dessa classe bacteriana nos mecanismos relacionados à ruptura anastomótica, e destaca a necessidade de investigações futuras para explorar essa possível relação.

Na literatura consultada também não foi encontrada nenhuma associação clara entre o aumento de *Actinobacteria* e o desenvolvimento de fístula anastomótica. Apenas um estudo, conduzido por Hernández-González *et al.* (2023), correlacionou essa elevação ao grupo sem fístula, sugerindo possível papel protetor.

Estudos anteriores identificaram *Proteobacteria* mais abundante em indivíduos que desenvolveram FA, tanto em amostras fecais (Jørgensen *et al.* 2024) quanto mucosa intestinal (Zamorano *et al.* 2023), além de sua elevação em pacientes com CCR quando comparados a indivíduos saudáveis (Palmisano *et al.* 2020). Zamorano *et al.* (2023) associaram o aumento do filo *Proteobacteria* à elevação da classe *Gammaproteobacteria* e, subsequentemente, da ordem *Enterobacterales* em pacientes que desenvolveram FA (Zamorano *et al.* 2023). Além de

identificada como possível marcador no desenvolvimento de FA, também já foi identificada com potencial fator patogênico (Mizuta *et al.* 2016). Em contraste, encontramos abundância superior no grupo controle, com aumento significativo após a terapia antibiótica ($p < 0,001$), embora sem diferença estatística entre indivíduos que desenvolveram ou não fístula. Essa elevação pode estar relacionada à maior presença de *Gammaproteobacteria*, cuja abundância superou 10% no grupo controle, possivelmente em função do aumento de *Enterobacteriaceae*. Enquanto no grupo caso, esse aumento acima de 10% foi observado na classe *Bacilli*, que inclui bactérias aeróbias facultativas ou obrigatórias, já previamente associadas ao risco de FA, com destaque para o aumento das espécies de *Gemella* (Shi *et al.* 2022; Shogan *et al.* 2015; Olivas *et al.* 2012; Zamorano *et al.* 2023), com abundância relativa inferior a 0,01%, que apesar de visivelmente superior no grupo caso não apresentaram relevância estatística, *Gemella sanguinis* ($p=0,181$), *Gemella morbillorum* ($p=0,076$), assim como o gênero *Gemella* (caso=0,003; controle=0,0009). A espécie *Gemella haemolysans* ($p=0,986$) foi a única superior no grupo controle, no entanto *G. morbillorum* tem sido reportada como duas vezes mais patogênica que *G. haemolysans* (García-López e Martín-Galiano 2020).

Algumas variações pontuais em táxons com frequência relativa inferior a 0,1% também merecem destaque por exibirem relevância estatística. Entre os táxons da coleta 1 destacou-se no grupo controle, a ordem *Erysipelotrichales* ($p=0,016$) enquanto, no grupo caso, a ordem *Bacillales* ($p=0,022$) e o gênero *Romboutsia* ($p=0,030$).

Considerando que, em faixas de frequência relativa baixas (entre 0,1% e 0,01%), é comum observar grande variabilidade, optamos por priorizar níveis taxonômicos mais elevados, visando maior robustez na interpretação dos dados. Na coleta 1, apenas a família *Monoglobaceae* ($p=0,044$) foi relevante no grupo controle, e no grupo caso a família *Staphylococcaceae* ($p=0,014$) se destacou, corroborando estudos anteriores que identificaram maior abundância desta família nos pacientes que desenvolveram fístulas (Harrel *et al.* 2012). *Staphylococcus aureus* também já foi associada a formação de biofilmes, estruturas microbianas complexas formadas por comunidades bacterianas aderidas a superfícies e envoltas por uma matriz de substâncias extracelulares (Cucarella *et al.* 2001). Esses biofilmes conferem uma série de vantagens adaptativas às bactérias, como maior resistência a agentes antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro, podendo representar um fator de risco para FA ao atuarem como barreiras físicas que dificultam a deposição de colágeno e a re-

epitelização, processos essenciais para a cicatrização tecidual adequada (Cucarella *et al.* 2002; Tytgat *et al.* 2019).

Na coleta 2, apenas a classe e ordem *Tissierellales* ($p=0,008$) apresentaram diferença estatística com maior abundância no grupo caso. Esse achado ganha relevância adicional pelo fato de em todos os níveis taxonômicos avaliados, táxons pertencentes a essa linhagem apresentarem valores de $p < 0,05$, todos associados à espécie *Parvimonas micra*, sugerindo um sinal biológico consistente ao longo da hierarquia taxonômica. O gênero e a espécie *Parvimonas micra*, embora ainda não correlacionada diretamente ao desenvolvimento de FA, vêm sendo associada ao desequilíbrio na microbiota intestinal observada em casos de câncer colorretal (Löwenmark *et al.* 2020) sendo sugerida como potencial marcador biológico em amostras de fezes para diagnóstico de CCR. Essa espécie comumente encontrada na cavidade oral (Rams *et al.* 1992), tem capacidade de se translocar da cavidade subgengival para o intestino (Conde-Pérez *et al.* 2024; Dai *et al.* 2018; Osman *et al.* 2021; Saffarian *et al.* 2019; Zhao *et al.* 2022). Um estudo chegou a correlacionar essa espécie com a redução da sobrevivência em pacientes com CCR (Löwenmark *et al.* 2022). Os táxons *Romboutsia*, *Erysipelotrichales*, *Tissierellia* e *Monoglobaceae* também não tiveram nenhuma citação encontrada com possível fator patogênico no desenvolvimento de FA.

Embora o perfil global da microbiota tenha se mostrado relativamente estável entre os grupos estudados, variações específicas em determinados táxons podem refletir alterações funcionais relevantes. Tais achados reforçam a importância de análises em múltiplos níveis taxonômicos para a identificação de potenciais biomarcadores ou consequências associadas ao tratamento.

Análises univariadas consideram variáveis de forma isolada, podendo gerar interpretações enviesadas ao desconsiderar fatores de confusão. Em contrapartida, abordagens multivariadas permitem avaliar os efeitos de uma variável de interesse controlando simultaneamente outras covariáveis, o que é essencial em estudos de microbiota, marcados pela elevada complexidade biológica e técnica.

Dessa forma, com o objetivo de identificar táxons diferencialmente abundantes entre casos e controles nos diferentes momentos de coleta, utilizamos a ferramenta MaAsLin2 (Microbiome Multivariable Associations with Linear Models). Esta ferramenta foi desenvolvida especificamente para análises multivariadas em estudos de microbioma, permitindo

identificar associações entre perfis microbianos e variáveis clínicas ou ambientais em contextos complexos. O MaAsLin2 utiliza modelos lineares generalizados e mistos, oferecendo suporte a dados brutos ou relativos, com ou sem covariáveis e medições repetidas, sendo particularmente eficaz diante de desafios como composicionalidade, alta dispersão, zero-inflação e alta dimensionalidade que são comuns em dados ômicos. Essa abordagem se mostrou adequada para lidar com a heterogeneidade das amostras analisadas e garantir maior precisão na identificação de associações microbianas relevantes (Mallick *et al.* 2021; Nearing *et al.* 2022).

A análise multivariada foi realizada incorporando as variáveis idade, gênero e localização (cólon direito, cólon esquerdo e reto) como potenciais fatores de confusão e os resultados com q-valor $<0,05$ podem ser observados na **Figura 8**.

Na coleta 1, nenhum táxon abaixo do nível de família apresentou destaque estatístico, e nenhum atingiu q-valor $<0,05$ após correção para múltiplas comparações utilizando o método False Discovery Rate (FDR) de Benjamini-Hochberg (no máximo, 5% de falsos positivos entre os achados significativos).

Contudo, vale ressaltar a ordem *Bacillales* (coleta 1: $p=0,009$ e $q=0,153$; coleta 2: $p=0,004$ e $q=0,063$) e a classe *Negativicutes* (coleta 1: $p=0,028$ e $q=0,139$; coleta 2: $p=0,028$ e $q=0,204$) que se mantiveram diferencialmente abundantes em ambas as coletas no grupo caso, demonstrando forte resistência a profilaxia antimicrobiana.

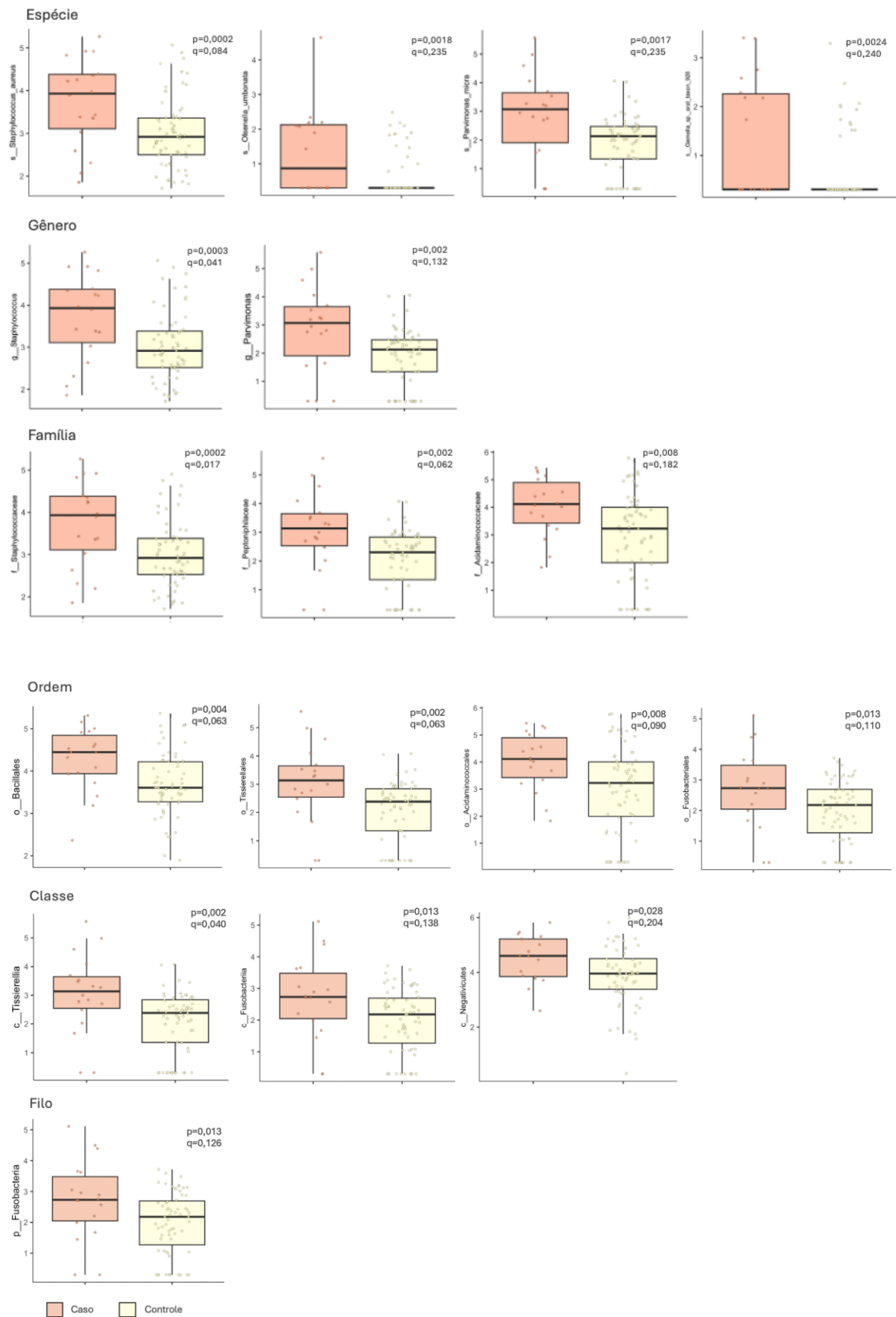
Na Coleta 2, apenas três táxons apresentaram valor de $q < 0,05$, representando possíveis biomarcadores associados ao desenvolvimento de fístula. O gênero *Staphylococcus* ($p < 0,001$; $q=0,041$) e sua respectiva família *Staphylococcaceae* ($p < 0,001$; $q=0,017$) se destacaram no grupo caso, com ênfase para a espécie *Staphylococcus aureus* ($p < 0,001$; $q=0,084$), que embora não tenha atingido significância estatística após correção, demonstrou tendência relevante. Além disso, a classe *Tissierellia* ($p=0,002$; $q=0,040$) também foi significativamente mais abundante entre casos. Esse achado reforça a consistência observada anteriormente para essa linhagem ao longo dos níveis taxonômicos, já que a espécie *Parvimonas micra* ($p=0,001$; $q=0,235$), pertencente à mesma classe, também apresentou p-valor significativo. Além disso, os níveis de família e ordem relacionados a essa linhagem mostraram tendência à significância no valor de q ($q=0,062$ e $q=0,063$, respectivamente), sugerindo um sinal robusto e biologicamente coerente.

A classe *Negativicutes* ($p=0,028$; $q=0,204$), e seus níveis taxonômicos inferiores *Acidaminococcales* ($p=0,008$; $q=0,090$) e *Acidaminococcaceae* ($p=0,008$; $q=0,182$), assim como na abundância relativa, se mantiveram significativos na abundância diferencial. Adicionalmente, o único filo diferencialmente abundante identificado foi o *Fusobacteria* ($p=0,013$; $q=0,126$), seguido da classe *Fusobacteriia* ($p=0,013$; $q=0,138$) e ordem *Fusobacteriales* ($p=0,013$; $q=0,110$). O gênero *Fusobacterium* e a família *Fusobacteriaceae* já foram descritos como mais prevalentes em indivíduos que desenvolvem fístula anastomótica (FA) (Shi *et al.* 2022), sendo a espécie *Fusobacterium nucleatum* a mais frequentemente apontada como possível marcador, devido à sua capacidade de ativar collagenases (Shi *et al.* 2022; Shogan *et al.* 2015; Olivas *et al.* 2012). No entanto, um estudo conduzido por Mima *et al.* (2020) não conseguiu replicar esses achados.

Além da associação com FA, o aumento na abundância de *F. nucleatum* também tem sido amplamente relacionado a uma diversidade microbiana reduzida e ao desenvolvimento CCR. Esse vínculo se deve ao seu potencial carcinogênico, mediado por múltiplos mecanismos, incluindo danos ao DNA, evasão do sistema imunológico e reprogramações metabólicas (Castellarin *et al.* 2012; Yu *et al.* 2017; Kostic *et al.* 2013; Liao *et al.* 2025; Osman *et al.* 2021, Saffarian *et al.* 2019; Saito *et al.* 2025). Um dos principais mecanismos descritos é a expressão do fator de virulência FadA na superfície celular, que induz a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina (Rubinstein *et al.* 2019). Além disso, *F. nucleatum* tem demonstrado capacidade de indução de quimiorresistência (Jiang *et al.* 2023; Yu *et al.* 2017), e seu uso como biomarcador diagnóstico para CCR já foi sugerido (Wong *et al.* 2016). Os estudos também apontam uma redução na sobrevida global (Chen *et al.* 2019; de Carvalho *et al.* 2019; Mima *et al.* 2016), bem como uma forte associação com menor sobrevida livre de recorrência (Yu *et al.* 2017).

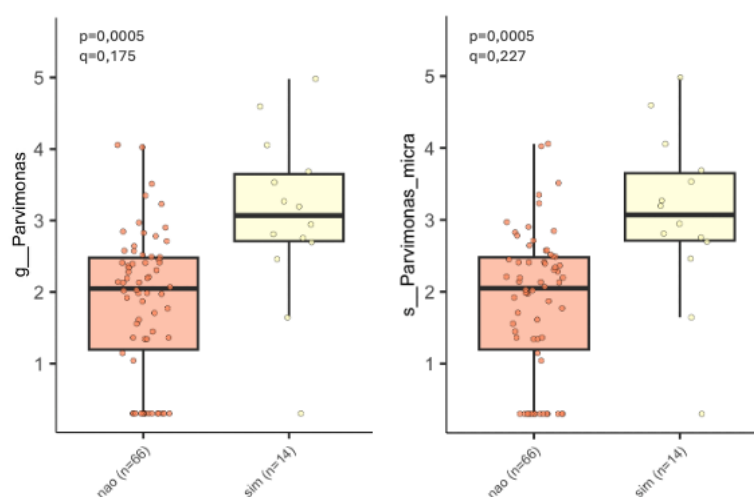
A espécie *F. nucleatum* foi encontrada em baixa abundância nesse estudo (caso $<0,01\%$; controle $<0,001\%$), no entanto após terapia antimicrobiana o grupo controle apresentou uma redução significativa dessa espécie ($p=0,052$), algo não observado entre os casos.

Figura 8: Distribuição dos táxons com abundância diferencial nos diferentes níveis taxonômicos identificados após terapia antimicrobiana (GE2).



Ainda no escopo da análise multivariada, foi realizada uma nova abordagem utilizando a necessidade de reoperação como variável de efeito fixo, além da inclusão de idade, gênero e localização anatômica como potenciais fatores de confusão. No total, 16 pacientes precisaram ser submetidos à reoperação, sendo 15 do grupo caso e apenas um do grupo controle, selecionado no pareamento mais abrangente, devido ao prolapso da ileostomia. Dois dos pacientes do grupo caso que passaram por reoperação não tiveram amostras coletadas, resultando em um total de 14 pacientes avaliados nesta análise. Onde todos os pacientes após terapia antimicrobiana apresentaram como marcador de abundância diferencial a espécie *Parvimonas micra* e o gênero *Parvimonas* (Figura 9).

Figura 9: Táxons diferencialmente abundantes em pacientes que necessitaram reintervenção cirúrgica após terapia antimicrobiana (GE2).



Conforme discutido anteriormente, *Parvimonas micra* vem sendo associada à patogênese do câncer colorretal. No entanto, tanto a espécie quanto o gênero *Parvimonas* vem sendo mais explorados nos últimos anos, com um número crescente de estudos mencionando esses táxons. *Parvimonas micra* é um organismo anaeróbico e gram-positivo, anteriormente conhecido como *Peptostreptococcus micros* e *Micromonas micros*, tendo sido reclassificado com seu nome atual em 2006 (Tindall e Euzéby 2006). O gênero *Parvimonas* é atualmente composto apenas por duas espécies formalmente descritas, *Parvimonas micra* e *P. parva*, além de cepas ainda não classificadas a nível de espécie, referidas como *Parvimonas* sp. (NCBI

2025). Essa espécie é característica da microbiota oral, sendo um agente bem conhecido na etiologia da periodontite (Denes e Barraud 2016). Fora da cavidade oral, há poucos relatos relacionando essa espécie à patogênese de outras doenças, mas existem descrições do envolvimento de *P. micra* em casos de espondilodiscite, artrite séptica, abscessos de iliopsoas, osteomielite vertebral, endocardite e meningite (Bohra, Cwian e Peyton 2018; Ho *et al.* 2018; Ko *et al.* 2015; Pilmis *et al.* 2015; Sawai *et al.* 2019; Saishoji, Mori e Izumi 2024; Stoll *et al.* 1996; Uemura *et al.* 2014).

P. micra e *F. nucleatum* são frequentemente encontradas em maior abundância em pacientes com câncer colorretal e periodontite, apresentando capacidade de translocação para o intestino (Horiuchi *et al.* 2020), possivelmente em associação com o uso de inibidores de bomba de prótons (uma das drogas mais usadas na atualidade) (Bavishi e Dupont 2011; Jackson *et al.* 2016). A coexistência dessas espécies levou à investigação de suas interações, onde foi demonstrado que *P. micra* tem capacidade formar biofilmes em sinergia com *F. nucleatum* em lesões orais podendo influenciar na colonização dessas espécies (Horiuchi *et al.* 2020).

A capacidade de formação de biofilmes por essas espécies, associada à sua translocação para o intestino, reforça a hipótese de que estas possam de fato compor a microbiota intestinal em estados inflamatórios ou disbióticos. Considerando que infecções odontológicas e procedimentos dentários prévios à cirurgia colorretal são eventos relativamente comuns, e muitas vezes subvalorizados na prática clínica, torna-se fundamental investigar mais profundamente esta relação.

Contudo, embora a coleta 1 tenha apresentado maior número de espécies e gêneros com diferenças aparentes de abundância diferencial, apenas na coleta 2 foram identificados táxons diferencialmente abundantes após correção FDR. Esse resultado pode ser atribuído ao impacto da antibioticoterapia, que reduz a diversidade global e uniformiza a microbiota, revelando padrões de associação mais consistentes entre grupos. Além disso, é possível que os táxons identificados na coleta 2 reflitam a seleção de microrganismos com mecanismos de resistência antimicrobiana, fazendo com que persistam e até possam se expandir em um ambiente disbiótico.

Como mencionado, os fármacos com ação antibiótica utilizados na profilaxia dos pacientes deste estudo foram metronidazol e neomicina. O metronidazol é um anti-infeccioso

da família dos nitro-5-imidazóis, que apresenta espectro de atividade antimicrobiana que abrange exclusivamente microrganismos anaeróbios. Esse fármaco é metabolizado no fígado por oxidação, originando principalmente o metabólito alcoólico com cerca de 30% da atividade bactericida do composto original e o metabólito ácido com 5% de atividade bactericida. Espécies habitualmente sensíveis (mais do que 90% das cepas da espécie são sensíveis): *Peptostreptococcus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium_difficile*, *Clostridium sp*, *Bacteroides sp*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*. Espécies com sensibilidade variável: *Bifidobacterium*, *Eubacterium*. Espécies habitualmente resistentes (pelo menos 50% das cepas da espécie são resistentes): *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Mobiluncus*. Atividade antiparasitária: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis* (Neo Química 2025).

A neomicina é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos, que tem ação principalmente contra bactérias aeróbias gram-negativas. Seu mecanismo baseia-se na inibição da síntese proteica bacteriana por meio da ligação à subunidade 30S do ribossomo, resultando em erros na tradução e morte celular (Kotra, Haddad e Mobashery 2000). Quando administrada por via oral, apresenta absorção sistêmica mínima, o que a torna particularmente eficaz para atuação local no trato gastrointestinal. Essa característica é explorada tanto no preparo pré-operatório de cólon quanto no manejo da encefalopatia hepática, pela sua capacidade de reduzir a carga de bactérias produtoras de amônia (Veirup e Kyriakopoulos 2025; Waksman, Lechevalier e Harris 1949). Espécies habitualmente sensíveis: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*. Espécies com sensibilidade variável: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*. Espécies habitualmente resistentes: *Bacillus subtilis*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* (Waksman e Lechevalier 1949).

Ao analisar especificamente as espécies e gêneros identificados como sensíveis aos antimicrobianos utilizados na profilaxia, observa-se na **Tabela 17** que após a administração dos fármacos, os indivíduos do grupo que desenvolveu fístula apresentaram relativa estabilidade na abundância relativa desses táxons, mesmo entre aqueles com alta sensibilidade conhecida. Em contraste, o grupo controle apresentou uma redução significativa desses microrganismos.

Tabela 17: Perfil microbiológico de táxons suscetíveis a profilaxia antimicrobiana com neomicina e metronidazol (GE2).

Neomicina	Caso	Valor de p	Controle	Valor de p	Sensibilidade
<i>Enterococcus_faecalis</i>	0,0001	0,539	0,0001	0,425	Alta
<i>Escherichia_coli</i>	0,0195	0,409	0,0380	0,135	Alta
<i>Staphylococcus_aureus</i>	0,0049	0,017	0,0007	<0,001	Alta
<i>Klebsiella</i>	0,0003	0,278	0,0039	0,187	Variável
Metronidazol					
<i>Clostridium_sp._SY8519</i>	0,0002	0,133	0,0002	0,012	Alta
<i>Clostridium_perfringens</i>	0,00004	0,261	0,00005	0,196	Alta
<i>Clostridioides_difficile</i>	0,0030	0,244	0,0037	0,008	Alta
<i>Prevotella</i>	0,0002	0,299	0,0002	0,002	Alta
<i>Fusobacterium</i>	0,00007	0,409	0,00004	0,019	Alta
<i>Veillonella</i>	0,0027	0,439	0,0011	0,003	Alta
<i>Bacteroides_fragilis</i>	0,0040	0,086	0,0043	<0,001	Alta
<i>Bifidobacterium</i>	0,0085	0,916	0,0110	0,143	Variável
<i>Eubacterium</i>	0,0015	0,657	0,0009	0,047	Variável

A espécie *Staphylococcus aureus*, reconhecida por sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, foi detectada em ambos os grupos. No entanto, sua abundância foi significativamente maior entre os casos na coleta 1 ($p=0,017$), com tendência à significância também na coleta 2 ($p=0,062$). Apenas nos casos o gênero *Veillonella*, demonstrou comportamento de resistência, sendo associado positivamente em indivíduos que praticam atividade física vigorosa (Manor *et al.* 2020).

Notamos também que o padrão de resposta à neomicina foi semelhante entre os grupos, sugerindo um efeito mais uniforme desse antimicrobiano. Por outro lado, o metronidazol apresentou eficácia bastante distinta, com impacto mais pronunciado no grupo controle, sugerindo uma resposta menos uniforme entre os grupos.

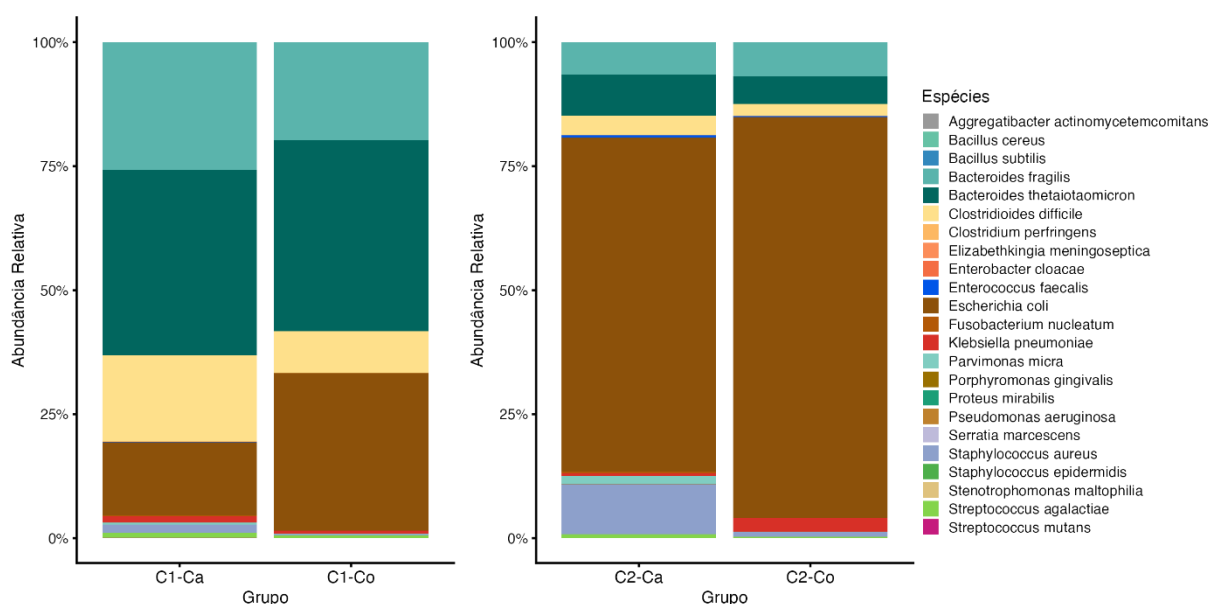
Esses achados reforçam indícios de que o grupo caso pode abrigar microrganismos com mecanismos de resistência antimicrobiana, os quais poderiam ter contribuído para a manutenção da composição microbiana mesmo após a profilaxia. A partir dessa observação, aprofundamos a investigação sobre genes relacionados à resistência antimicrobiana, conforme apresentado na seção 4.2.4

Devido à ausência de dados funcionais derivados do sequenciamento metagenômico, como a anotação de genes diretamente associados à atividade collagenolítica, optamos por uma abordagem preliminar baseada na presença de espécies bacterianas com potencial

colagenolítico previamente descritas na literatura. Para essa triagem, utilizamos dois estudos conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisa: um artigo de revisão sistemática que sumariza evidências clínicas de bactérias produtoras de collagenase em casos de fístula anastomótica em humanos (Jørgensen *et al.* 2024), e um estudo observacional que comparou o microbioma fecal basal de pacientes com e sem fístula após cirurgia de câncer colorretal. Essa estratégia permitiu identificar espécies com potencial implicação clínica, ainda que sem confirmação direta da expressão de enzimas colagenolíticas nas amostras analisadas.

Ao comparar o conjunto de espécies identificadas em ambos os artigos, observou-se que o padrão de distribuição entre as amostras e os momentos de coleta foi distinto entre os grupos, conforme ilustrado na **Figura 10**.

Figura 10: Distribuição das espécies bacterianas com potencial para produção de collagenases entre os grupos casos e controles do GE2.



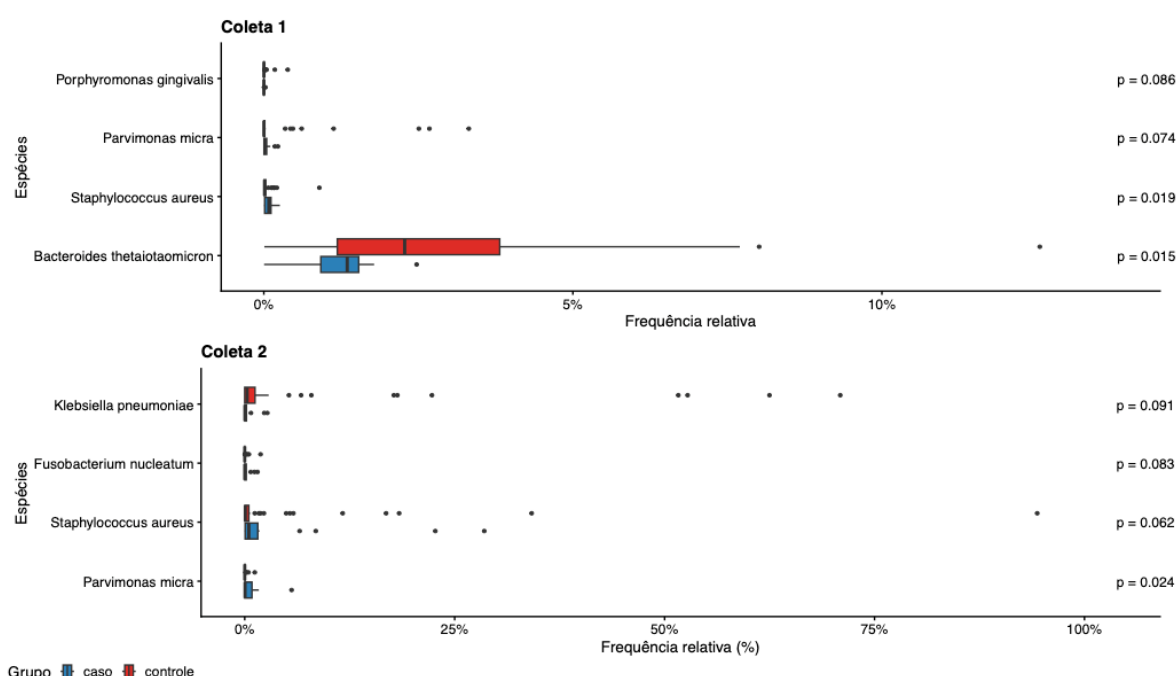
Legenda: C1-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 1; C1-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 1; C2-Co: amostras do grupo controle coletadas no momento 2; C2-Ca: amostras do grupo caso coletadas no momento 2

No entanto, no primeiro momento de coleta, apenas duas espécies apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos: *Bacteroides thetaiotaomicron* ($p=0,015$) com maior abundância no grupo controle e *Staphylococcus aureus* ($p=0,019$) no grupo caso. E apenas outras duas espécies demonstraram tendência de significância (**Figura**

11), com *P. micra* mais abundante no grupo caso e *Porphyromonas gingivalis* no grupo controle.

Já no segundo momento de coleta, apenas *P. micra* apresentou diferença significativa ($p=0,028$), enquanto outras três espécies indicaram tendência estatística, onde para a espécie *Staphylococcus aureus* ($p=0,062$), ao remover uma amostra do grupo controle (F-0144), considerada um outlier, o valor estatístico foi reduzido para $p=0,046$, atingindo significância. Apenas a espécie *Klebsiella pneumoniae* apresentou maior abundância no grupo controle.

Figura 11: Espécies bacterianas com potencial para produção de collagenases do GE2.

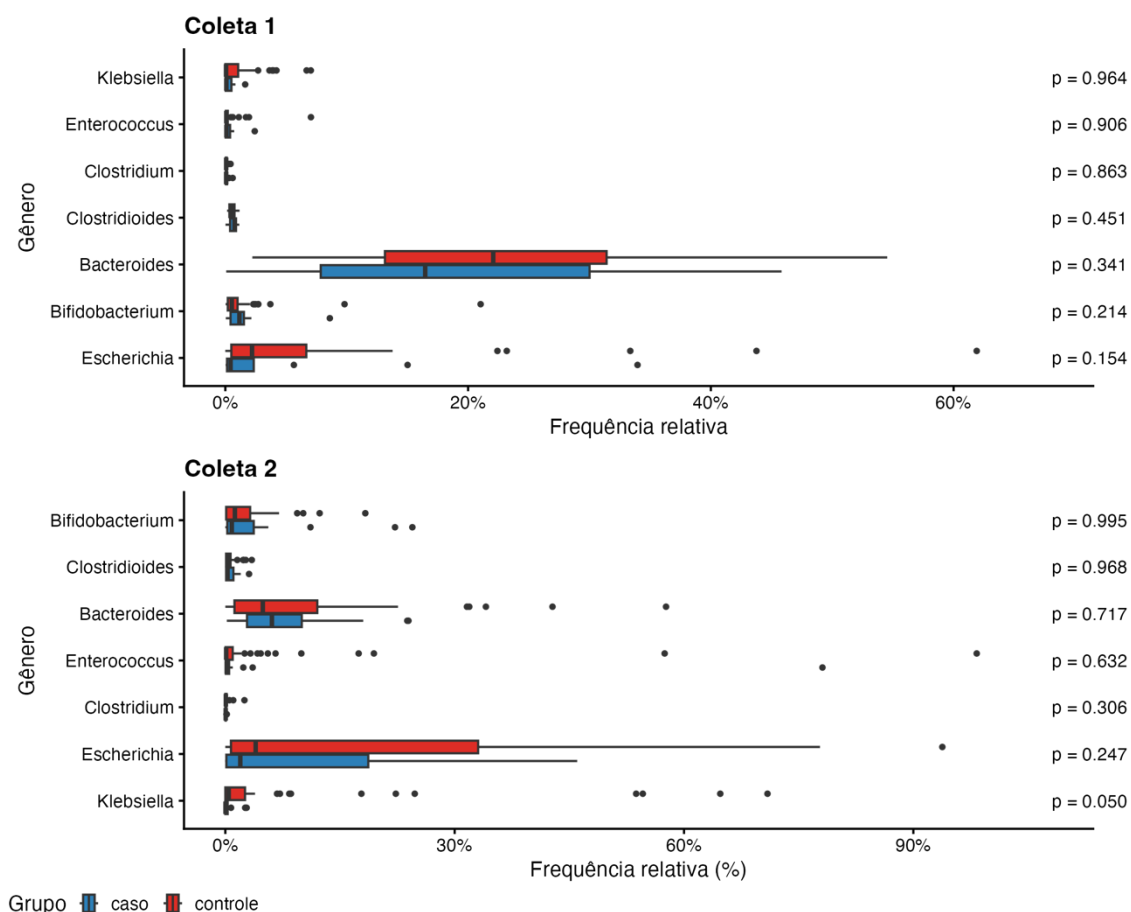


Dando continuidade à investigação, a próxima etapa da análise concentrou-se nos gêneros bacterianos previamente identificados no artigo de revisão sistemática como potenciais produtores de collagenase, visando maior robustez e confiabilidade aos achados para a identificação de padrões microbiológicos com possível implicação na fisiopatologia das fístulas.

Nessa etapa, os gêneros *Proteus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* apresentaram frequência inferior a 75% de ocorrência nas amostras, o que compromete sua robustez como indicadores microbiológicos. Entre os demais sete gêneros avaliados, apenas *Klebsiella*

demonstrou valor significativo limítrofe ($p=0,050$) com maior abundância no grupo controle, enquanto os demais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos comparados. Esses achados estão ilustrados na **Figura 12**.

Figura 12: Gêneros bacterianos com potencial para produção de collagenases do GE2.



Essa análise preliminar das espécies bacterianas com potencial collagenolítico, demonstrou diferenças modestas entre os grupos avaliados. Ainda que algumas espécies, como *S. aureus* e *P. micra*, tenham apresentado maior abundância no grupo com fístula, os achados foram pontuais e, em sua maioria, não atingiram significância estatística robusta. A predominância de *Klebsiella pneumoniae* no grupo controle e a ausência de diferenças significativas para a maioria dos gêneros analisados sugerem que, embora a presença de bactérias produtoras de collagenase possa contribuir para a fisiopatologia das fístulas, essa associação não pôde ser confirmada de forma consistente com os dados disponíveis. Tais resultados reforçam a necessidade de análises funcionais complementares, incluindo

avaliação de expressão gênica ou atividade enzimática, para validar o papel dessas bactérias no desenvolvimento das fístulas.

Considerando a ausência de consenso na literatura sobre o papel benéfico ou patogênico de táxons específicos no desenvolvimento de fístulas anastomóticas, optamos por analisar a composição da microbiota com base na presença e ausência de táxons exclusivos em cada grupo, dentre os 10 mais abundantes selecionados acima. A presença de determinados táxons apenas no grupo controle foi interpretada como potencialmente protetora (verde), enquanto sua exclusividade no grupo caso foi considerada indicativa de possível efeito patogênico (roxo) (**Tabela 18**). Táxons que se repetiram entre os grupos foram excluídos.

Tabela 18: Perfil exclusivo de táxons no grupo caso ou controle (GE2).

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécies
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae		<i>Bacteroides fragilis</i>
				Bacteroides	<i>Bacteroides ovatus</i>
					<i>Bacteroides sp</i>
			Phocaeicola	<i>Phocaeicola dorei</i>	
			Rikenellaceae	Alistipes	<i>Alistipes shahii</i>
		Odoribacteraceae	-----	-----	
Firmicutes	Negativicutes*	Acidaminococcales*	Acidaminococcaceae**	-----	-----
	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	-----	-----
		Bacillales*	Staphylococcaceae*	-----	-----
	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	Anaerostipes hadrus
				Lachnospira	Lachnospira eligens
Coriobacteriales				Coriobacteriaceae	Collinsella

Superior no grupo caso: * p<0,05; ** p<0,006.

Em verde, a presença de determinados táxons apenas no grupo controle foi interpretada como potencialmente protetora e em roxo, a presença exclusiva no grupo caso foi considerada indicativa de possível efeito patogênico.

No gênero *Bacteroides* foram identificadas 3 espécies, onde duas com possível potencial benéfico e um patogênico, corroborando possíveis divergências na literatura quanto ao gênero *Bacteroides* (Arumugam *et al.* 2011; Koren *et al.* 2013; Palmisano *et al.* 2020; van Praagh *et al.* 2019). O gênero *Phocaeicola* por sua vez, já havia sido identificado como mais frequente em pacientes sem FA (Lehr *et al.* 2024).

Esses achados estão em concordância com estudos prévios em humanos que observaram maior abundância da família *Lachnospiraceae* em pacientes que evoluíram com fístula (Shi *et al.* 2022; Shogan *et al.* 2014; Van Praagh *et al.* 2019).

A maior abundância da ordem *Bacillales*, seguido da elevação significativa na família *Staphylococcaceae* reforça evidências anteriores que associaram o gênero *Staphylococcus* ao desfecho de fístula (Harrel *et al.* 2012).

A intransponibilidade durante a colonoscopia foi mais frequente no grupo caso, o que poderia, em teoria, influenciar o perfil bacteriano intestinal devido a fatores como preparo inadequado ou estase/retenção fecal. Contudo, ao avaliar o número de amostras sequenciadas, a distribuição entre os grupos foi semelhante (coleta 1: quatro casos e três controles; coleta 2: sete casos e oito controles) o que reduz a probabilidade de que esse fator tenha gerado um viés relevante na comparação dos grupos. Ainda assim, por se tratar de uma condição capaz de modificar o microambiente intestinal e a representatividade das amostras, a intransponibilidade deve ser considerada uma potencial fonte de variação biológica e técnica, cuja influência não pode ser completamente descartada.

4.2.4 ANÁLISE DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (AMRs)

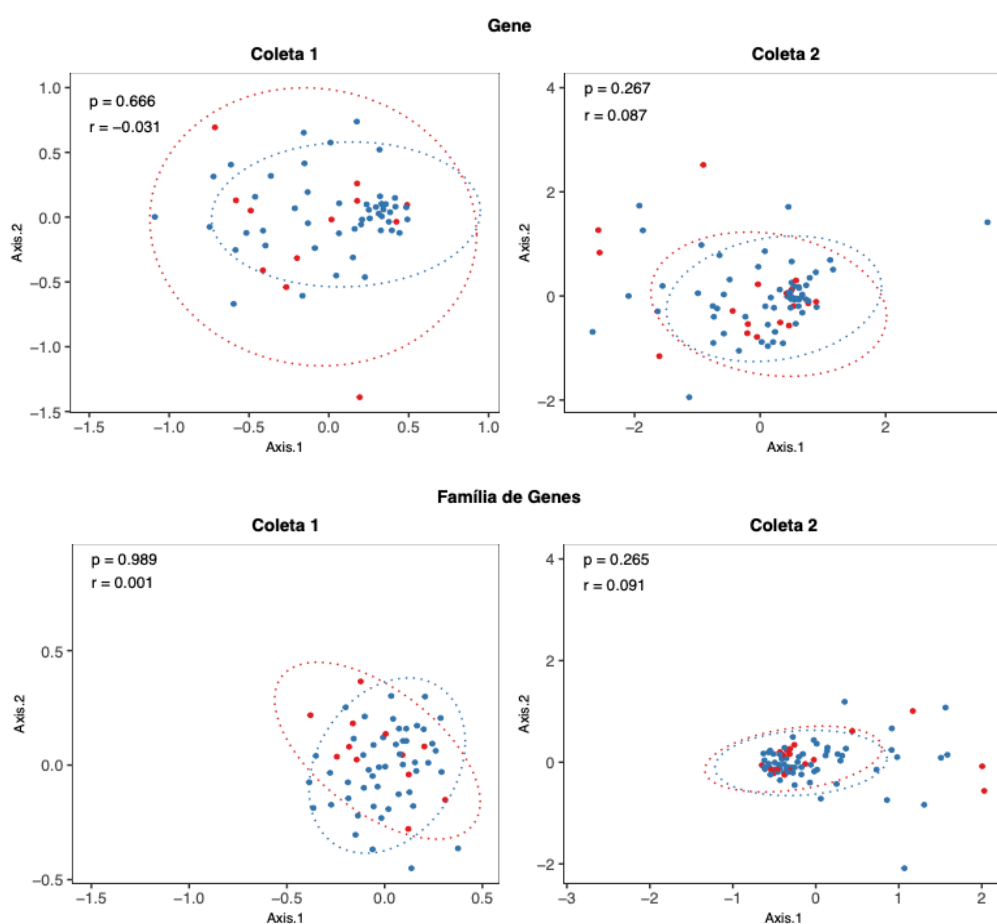
Na análise do perfil de resistência a antibióticos, identificamos 1.711 genes distribuídos em 305 famílias, 37 classes terapêuticas e 29 grupos farmacológicos. Esses genes estavam associados a sete mecanismos de resistência: efluxo de antibiótico, inativação do antibiótico, alteração do alvo do antibiótico, proteção do alvo do antibiótico, substituição do alvo do antibiótico, aquisição dependente do hospedeiro e permeabilidade reduzida do antibiótico.

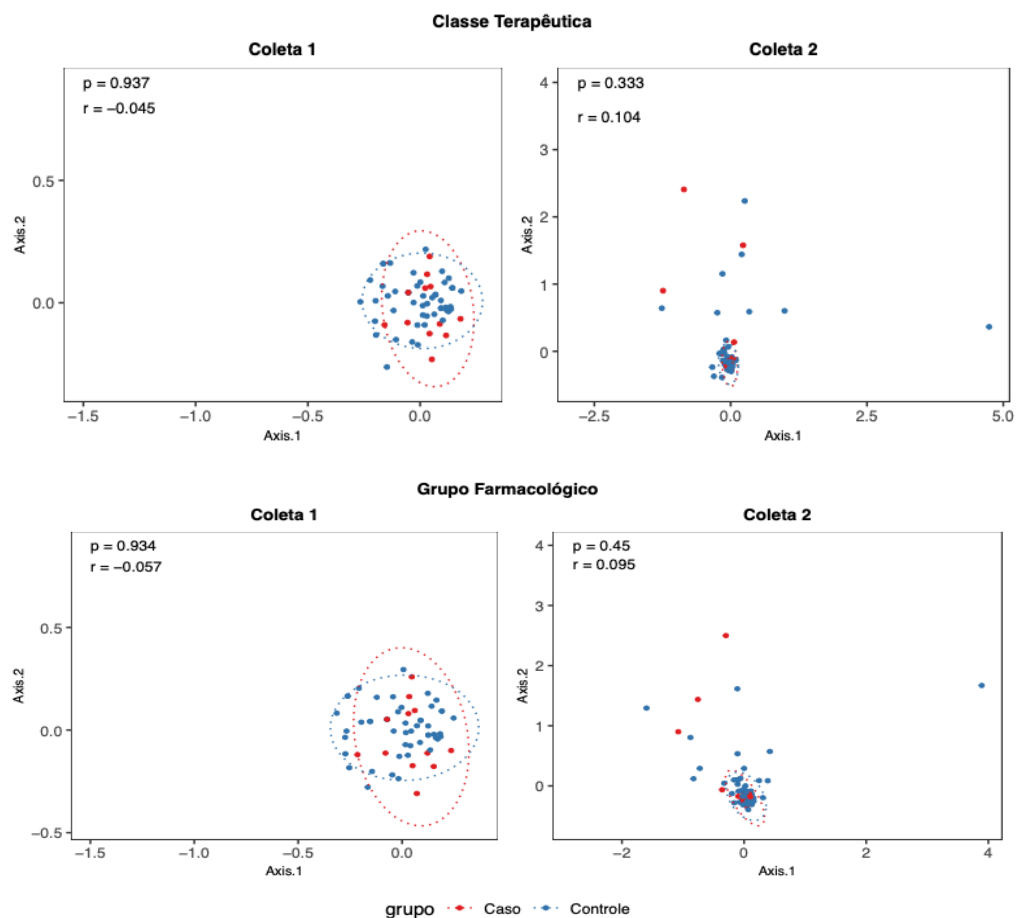
Na busca por identificar padrões de agrupamento ou separação entre as amostras, foi realizada uma análise de dissimilaridade utilizando o índice de Jaccard (Bray e Curtis 1957; Magurran 2004; Lance e Williams 1967), que avalia diferenças qualitativas com base apenas na presença ou ausência de genes, independentemente da sua abundância. A visualização dessas diferenças foi feita por meio do Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS).

Na análise de dissimilaridade, não encontramos diferenças significativas entre os grupos quando analisamos os perfis de resistência a partir da presença ou ausência de genes individuais. Esse mesmo padrão foi observado ao se avaliar separadamente a presença ou ausência quando os genes foram agrupados em família, classes terapêuticas, grupos farmacológicos, conforme **Figura 13**. Adicionalmente, para as variáveis família de genes,

classes terapêuticas e grupos farmacológicos, também testamos uma abordagem agrupada, classificando os perfis como *multifamília* ou *multiclasse*, de acordo com a diversidade de categorias identificadas em cada amostra. No entanto, mesmo com essa estratégia, não observamos diferenças estatisticamente significativas nem tendências claras de separação entre os grupos. Esses resultados indicam que os grupos caso e controle apresentaram perfis de resistência antimicrobiana globalmente semelhantes.

Figura 13: Análise de dissimilaridade entre os grupos caso e controle do GE2.

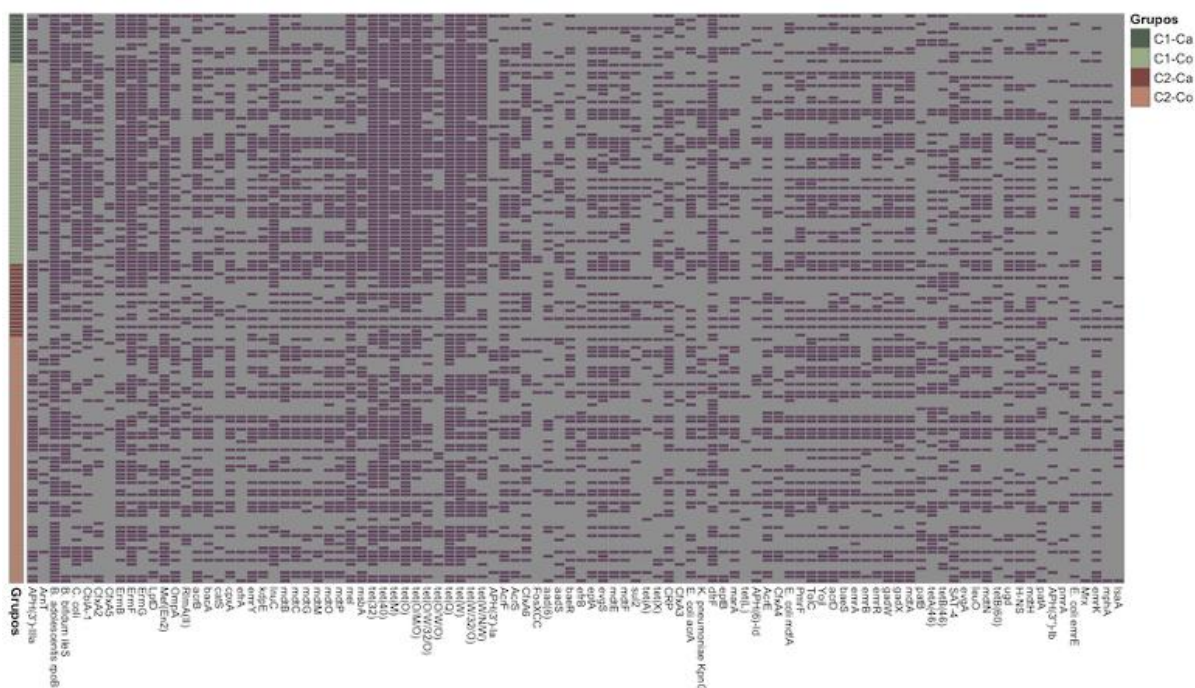




Legenda: O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras, e PERMANOVA para coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

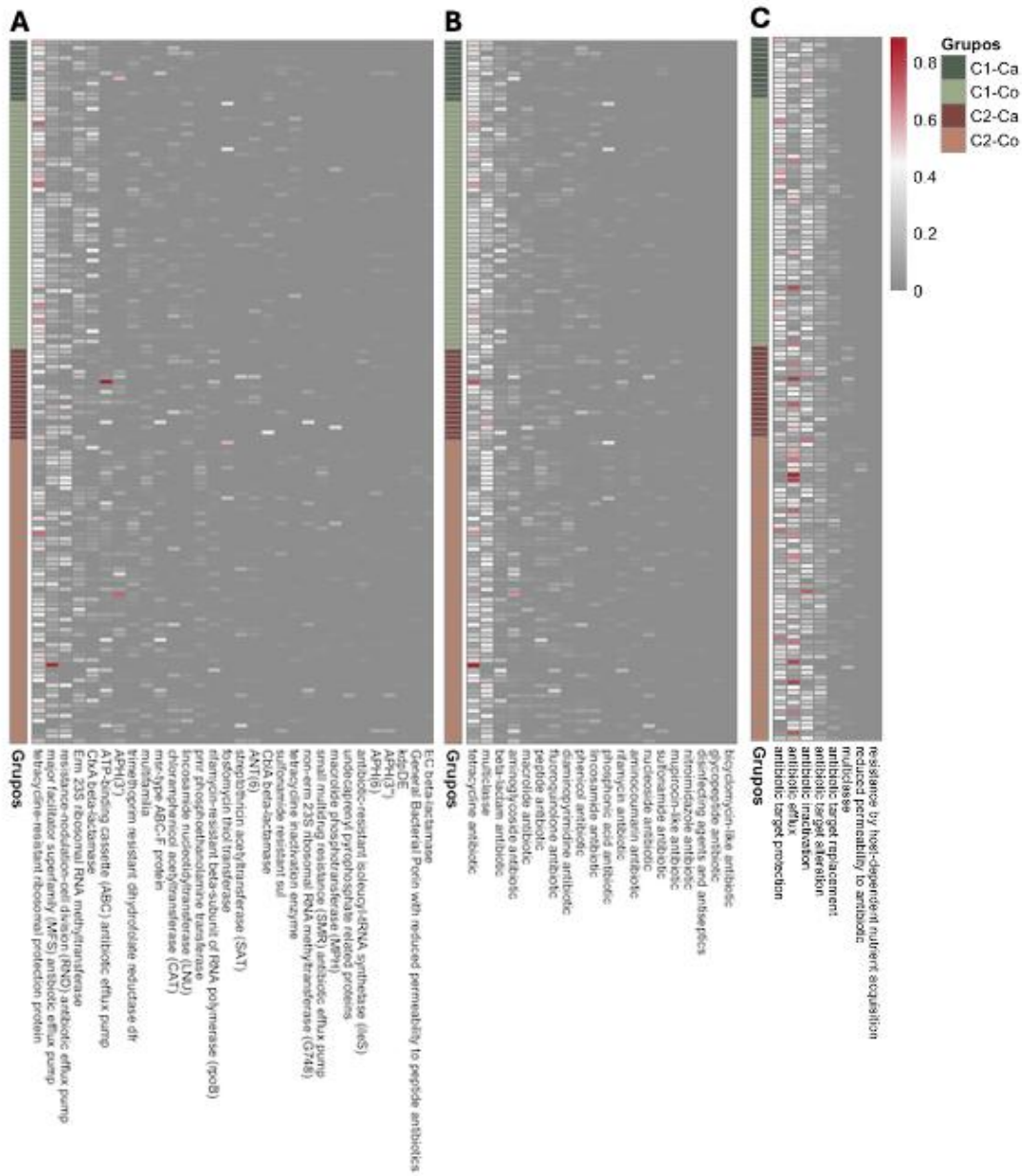
Ao analisarmos individualmente cada amostra (**Figura 14**), observamos uma distribuição esparsa e heterogênea dos genes de resistência entre os grupos avaliados, sem evidência de um padrão claro de enriquecimento no grupo caso, como inicialmente esperado. Essa mesma tendência foi mantida mesmo após o agrupamento dos genes por famílias, classes terapêuticas e grupos farmacológicos, inclusive quando essas categorias foram consolidadas em *multifamílias* ou *multiclasse*. Da mesma forma, o padrão também se repetiu ao avaliarmos os mecanismos de resistência.

Figura 14: Distribuição dos genes de resistência antimicrobianos por amostra (GE2).



Para a análise de abundância relativa, a amostra F-0867 (GE2-Co) precisou ser excluída devido à presença de valores extremamente elevados, que destoavam do restante do conjunto de dados. De modo geral, observou-se que a maioria dos genes apresentou baixa abundância relativa, com poucos casos isolados de abundância mais acentuada. Esse mesmo padrão se manteve mesmo após o agrupamento dos genes em famílias, classes terapêuticas, grupos farmacológicos e mecanismos de resistência (**Figura 15**).

Figura 15: Abundância relativa dos genes de resistência antimicrobianos distribuídos por amostra (GE2).



Legenda: A: família de genes; B: classe terapêutica; C: mecanismos de resistência

Apesar da ampla diversidade de genes identificados, poucos apresentaram distribuição homogênea dentro dos grupos (C1-Ca, C1-Co, C2-Ca, C2-Co), sendo observados majoritariamente de forma pontual. A **Tabela 19** apresenta os genes detectados em mais de 75% das amostras de cada grupo. No entanto, na segunda coleta, nenhum gene atingiu frequência superior a 85%. Não foi identificada diferença estatisticamente significativa na

abundância relativa dos genes entre os grupos, apenas uma tendência à maior abundância do gene *tet(W/N/W)* no grupo controle.

Tabela 19: Abundância relativa dos genes de resistência antimicrobiana (GE2). O teste não paramétrico Wilcoxon foi utilizado para verificar a existência de diferença com significado estatístico entre os grupos quando $p \leq 0,05$.

Coleta 1			
Gene	Caso	Controle	Valor de p
APH(3')-IIIa	0,073*	0,019	0,928
B. adolescentis rpoB	0,010	0,007	0,162
B. bifidum ileS	0,004	0,003*	0,273
C. coli	0,038	0,020	0,132
CblA-1	0,018	0,015	0,712
dfrF	0,027	0,030	0,991
ErmB	0,016	0,011	0,308
ErmF	0,083	0,067	0,796
ErmG	0,023*	0,027	0,946
InuC	0,022	0,024	0,187
Mef(En2)	0,029	0,039	0,215
mel	0,026	0,017	0,627
tet(32)	0,006	0,015	0,261
tet(40)	0,029	0,018	0,012
tet(M)	0,009	0,005	0,735
tet(O)	0,079	0,067	0,727
tet(O/32/O)	0,002	0,003	0,909
tet(O/M/O)	0,007	0,006	0,603
tet(O/W/32/O)	0,005	0,005	0,829
tet(Q)	0,212	0,167	0,384
tet(W)	0,060	0,068	0,837
tet(W/32/O)	0,003	0,004	0,458
tet(W/N/W)	0,003	0,005	0,091
Coleta 2			
Gene	Caso	Controle	Valor de p
APH(3')-IIIa	0,042	0,059*	0,942
B. adolescentis rpoB	0,040	0,018	0,842
tet(40)	0,036	0,024*	0,932
tet(O)	0,043	0,064*	0,754
tet(Q)	0,083	0,077	1,000
tet(W)	0,053	0,063*	0,309

*Gene presente em menos de 75% das amostras

Os genes responsáveis por codificar enzimas que modificam aminoglicosídeos geralmente estão presentes em plasmídeos, facilitando sua disseminação entre diferentes células bacterianas. Muitos desses genes também estão inseridos em elementos genéticos móveis, como transposons e integrons, favorecendo sua rápida propagação em nível

molecular e contribuindo para a disseminação da resistência antimicrobiana (Ahmed e Shimamoto 2004; Mingeot-Leclercq, Glupczynski e Tulkens 1999). A literatura científica descreve diversas variantes gênicas associadas à aquisição de resistência a esse grupo, onde os principais mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos envolvem a produção de enzimas modificadoras, classificadas em três grupos funcionais principais: acetiltransferases (AAC), com as variantes *AAC(1)*, *AAC(2')*, *AAC(3)* e *AAC(6')*; nucleotidiltransferases ou adeniltransferases (*ANT*), com as variantes *ANT(2'')*, *ANT(3'')*, *ANT(4')*, *ANT(6)* e *ANT(9)*; e fosfotransferases (*APH*), com as variantes *APH(2'')*, *APH(3')*, *APH(3'')*, *APH(4)*, *APH(6)*, *APH(7'')* e *APH(9)* (Gad, Mohamed e Ashour 2011; Magnet e Blanchard 2005; Ramirez e Tolmanský 2010; Shaw *et al.* 1993; Wright 1999; Wright 2005). No entanto, diversos outros mecanismos também têm sido descritos, entre eles a enzima bifuncional *AAC(6')-APH(2'')* que confere um espectro de resistência devido sua capacidade de acetilar e fosforilar substratos (Kotra, Haddad e Mobashery 2000; Shaw *et al.* 1993), a presença de metiltransferases de 16S rRNA, que promovem metilação do sítio-alvo ribossomal impedindo a ligação dos aminoglicosídeos e a superexpressão de bombas de efluxo, que reduzem a concentração intracelular do antibiótico, contribuindo para níveis elevados de resistência (Gopalakrishnan *et al.* 2018; Wangkheimayum *et al.* 2020).

Nos nitroimidazóis a resistência geralmente resulta da atividade da enzima nitroimidazol redutase, que catalisa a conversão de 4- ou 5-nitroimidazol em 4- ou 5-aminoimidazol, impedindo a formação da forma ativa do metronidazol (Leiros *et al.* 2004; Reyssset 1996). O gene *nim* (variantes de A a G), responsável pela codificação dessa enzima, tem sido identificado tanto em elementos cromossômicos quanto em plasmídeos (Löfmark *et al.* 2005; Veloo *et al.* 2018). No entanto, a resistência ao metronidazol também pode resultar da combinação de diversos outros fatores e genes, como mutação nos genes *rdxA*, *frdX*, *recA* que codifica uma oxidoredutase envolvida na ativação do metronidazol (Goodwin *et al.* 1998; Marais *et al.* 2003; Pumbwe, Skilbeck e Wexler 2007; Sebahia *et al.* 2006; Sevillano *et al.* 2023).

Com a distribuição esparsa dos genes identificados e da elevada diversidade de genes com potencial impacto sobre a ação antibiótica, avaliamos as classes terapêuticas visando distinguir a resistência aos fármacos usados na profilaxia pré-cirúrgica, porém o padrão entre os grupos permaneceu muito semelhante. Entre os pacientes que desenvolveram fístula (coleta 2), 83,3% apresentaram genes de resistência a aminoglicosídeos e/ou nitroimidazóis,

isoladamente ou em associação com outras classes, enquanto no grupo controle, essa proporção foi de 82,3%, com nenhuma classe farmacológica se destacando estatisticamente entre os grupos. De modo consistente, ao examinarmos os mecanismos de resistência, o mesmo comportamento foi observado, sendo o mecanismo de efluxo de antibióticos o mais comum, encontrado em 100% dos pacientes do grupo caso e em 96,8% dos pacientes do grupo controle.

Contudo, os achados revelam perfis de resistência semelhantes, sugerindo que a pressão seletiva e a dinâmica de disseminação gênica não diferenciam os grupos estudados. No entanto, os resultados anteriores demonstraram uma redução significativa de bactérias sensíveis ao metronidazol apenas no grupo controle, além da presença diferencial de *P. micra* no grupo caso, uma espécie sensível ao metronidazol (Badr *et al.* 2020; Brazier *et al.* 2008; Murdoch 1998). Esse contraste entre os dados de resistência genotípica e os achados da composição bacteriana sugere que fatores adicionais podem ter influenciado a resposta ao antibiótico.

A complexidade envolvida entre a administração de uma dose e o alcance do efeito terapêutico desejado, reforça a importância de uma abordagem personalizada na farmacoterapia, uma vez que diversos fatores podem corroborar alterações na farmacocinética e farmacodinâmica afetando tanto sua eficácia quanto sua segurança clínica.

Com os avanços tecnológicos, diferentes áreas do conhecimento vêm sendo aprofundadas, permitindo uma melhor compreensão desses fatores. A farmacogenética, por exemplo, busca prever a resposta individual a determinados fármacos com base em variantes genéticas, permitindo antecipar se um paciente é capaz de metabolizar um medicamento de forma eficaz para alcançar o efeito terapêutico desejado (Persidis, 1998). Um estudo conduzido por Spear *et al.* (2001) revelou que as taxas de resposta variaram entre 50% e 75%, sugerindo que uma parcela considerável dos pacientes pode não se beneficiar plenamente do tratamento, mesmo na ausência de genes clássicos de resistência. Nesse estudo, os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2) apresentaram a maior taxa de resposta (até 80%), enquanto os agentes quimioterápicos tiveram desempenho mais limitado, com apenas 25% de eficácia.

Outra variável importante a ser considerada, é a farmacomicrobiômica, uma área emergente criada há pouco mais de uma década, dedicada a compreender como a microbiota

influencia a resposta a medicamentos, uma vez que a microbiota intestinal é capaz de alterar a farmacocinética (alterações na absorção, distribuição, metabolismo, excreção e dinâmica da concentração plasmática do medicamento) e a farmacodinâmica (alterações nos alvos do medicamento ou nas vias biológicas) resultando em suscetibilidade diferencial de cada organismo aos efeitos farmacológicos de diferentes fármacos (Caballero-Flores, Pickard e Nunez 2023; Saad, Rizkallah e Aziz 2012).

Zimmermann *et al.* (2019) demonstraram que aproximadamente dois terços dos medicamentos administrados por via oral (176 de 271) sofreram modificações químicas promovidas por pelo menos uma cepa bacteriana, sendo que uma única cepa foi capaz de metabolizar, em média, 40 fármacos (variando de 11 a 95). O estudo também identificou enzimas bacterianas específicas associadas à modificação de medicamentos e demonstrou que, ao serem transferidas para camundongos, essas enzimas alteraram de forma significativa o metabolismo intestinal e sistêmico dos fármacos. A produção ou manipulação de enzimas alterando a ação de medicamentos já vem sendo amplamente discutido, uma vez que esse mecanismo de resistência permite que bactérias resistentes e sensíveis sobrevivam em co-culturas (Hayase e Jenq 2021; Hancock, Nijnik e Philpott 2012; Peng *et al.* 2021, Piewngam *et al.* 2019; Yurtsev *et al.* 2009).

Além disso e dos diversos mecanismos de resistência descritos, como a aquisição de genes de resistência, mutações no DNA bacteriano e modificações nos receptores de ligação ou ligação inespecífica, também sabemos que a microbiota é capaz de mobilizar alterações no sistema imunológico e na barreira mucosa intestinal (Davar *et al.* 2021; Hancock, Nijnik e Philpott 2012; Klünemann *et al.* 2021; Koppel *et al.* 2017; Li *et al.* 2022; Liu *et al.* 2021; Lu *et al.* 2022b; McCulloch *et al.* 2022; Munier *et al.* 2015; Takiishi, Fenner e Camara 2017; Ting, Lau e Yu 2022).

Paralelamente às abordagens mais recentes, fatores fisiológicos clássicos, como o tempo de esvaziamento gástrico, presença de inflamação intestinal e interações medicamentosas ou com alimentos também podem impactar a biodisponibilidade de medicamentos (Alrubia *et al.* 2022; Bukowska *et al.* 2025; Hatton *et al.* 2029; Kambayashi e Shirasaka 2023; Riley *et al.* 1992; Stillhart *et al.* 2020; Wang *et al.* 2025), assim como fatores externos ao paciente, como diferentes formulações e até mesmo a equivalência farmacêutica entre medicamentos de referência e genéricos, que podem apresentar variações na

biodisponibilidade do fármaco entre 80% e 125%, dentro de um intervalo de confiança de 90% (Brasil, 2022).

As diferenças na resposta aos antibióticos entre os grupos analisados podem refletir uma ação multifatorial, resultante da interação entre variáveis genéticas, microbianas, imunológicas, fisiológicas e farmacotécnicas. Dentre os desafios adicionais à eficácia terapêutica, vale ressaltar que a presença de bactérias com capacidade de formação de biofilmes, pode comprometer a difusão do fármaco ao restringir o fluxo de fluídos e ampliar as distâncias de difusão dentro da matriz extracelular. A combinação de alta densidade celular e substâncias poliméricas extracelulares tende a dificultar o transporte convectivo e favorecer o predomínio de mecanismos difusivos mais lentos (Cucarella *et al.* 2002; de Beer, Stoodley e Lewandowski 1997; Stewart 2003; Stoodley, de Beer e Lewandowski 1994; Tytgat *et al.* 2019). Além disso, embora a presença de alimentos não afete a absorção total do metronidazol, pode reduzir sua concentração plasmática máxima (C_{max}) e retardar o tempo para atingi-la (FDA 2010; Zhang *et al.* 2014), o que pode reduzir o pico de concentração do fármaco ou deslocar sua janela terapêutica, limitando o fármaco atingir sua concentração inibitória mínima (CIM) (0,1 a 8 µg/mL) (Badr *et al.* 2020; Lamp *et al.* 1999; FDA 2010).

Considerando a complexa interação entre fatores genéticos, microbianos, farmacológicos e ambientais que modulam a resposta a antimicrobianos, a identificação de marcadores que sinalizem ineficácia terapêutica é estratégica. Quando incorporados à prática clínica, esses marcadores podem orientar diretrizes personalizadas — sobretudo em janelas terapêuticas críticas — favorecendo regimes mais precisos e melhor ajuste de dose e efeito.

5 CONCLUSÃO

Nossas análises clínicas e epidemiológicas mostraram uma associação significativa entre ocorrência de fístula anastomótica e fatores como tabagismo, intransponibilidade à colonoscopia pré-operatória e localização anatômica do procedimento. Embora a maioria das comorbidades e variáveis nutricionais não tenha apresentado correlação estatística robusta, observou-se uma tendência à maior prevalência de fístula nos pacientes com menor consumo de fibras, indicando possíveis influências contextuais e dietéticas que merecem investigação.

A ausência de redução na quantidade de sequências que mapeiam em genomas bacterianos entre as coletas 1 e 2 no grupo caso sugere a presença de bactérias resistentes/ineficiência dos antibióticos possam propiciar o surgimento de fístulas anastomóticas. Como evento similar foi observado com vírus em nosso estudo, é possível que estes sejam bacteriófagos que dependam de bactérias para sua multiplicação e, com a redução destas eles apresentem uma queda de abundância proporcional a este efeito. No entanto, a classificação taxonômica destes vírus ainda não foi avaliada.

A profilaxia combinada com neomicina e metronidazol reduziu significativamente a diversidade alfa no grupo controle, enquanto se manteve estável nos pacientes com fístula, sugerindo um papel da terapia antimicrobiana, talvez menos efetiva nos casos com FAs. Embora a diversidade beta global não tenha revelado distinções marcantes, o índice Canberra apontou diferenças associadas a táxons raros, reforçando o potencial papel desses microrganismos na evolução clínica.

A análise integrada da composição microbiana e abundância relativa evidenciou padrões heterogêneos entre os grupos, com destaque para espécies anaeróbias orais como *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum*, além de táxons da classe *Tissierellia* e *Negativicutes*, mais prevalentes nos casos, especialmente após a antibioticoterapia. A abordagem multivariada com controle de variáveis de confusão, reforçou a espécie *Parvimonas micra* e o gênero *Parvimonas* como possíveis biomarcadores neste desfecho.

A persistência de microrganismos reconhecidamente sensíveis ao metronidazol nos casos, em contraste com sua depleção significativa nos controles, aponta para a possível presença de mecanismos de resistência antimicrobiana. No entanto, apesar da ampla diversidade de genes de resistência identificados, diferenças significativas neste sentido, tanto

em termos de presença, quanto abundância ou agrupamentos funcionais, não foram encontradas. A análise de dissimilaridade também não revelou padrões consistentes entre os grupos. Esses achados reforçam a hipótese de que a resposta clínica à antibioticoterapia é modulada por múltiplos fatores além dos genes clássicos de resistência, como a formação de biofilmes, o metabolismo bacteriano de fármacos e variações farmacocinéticas individuais.

Diante disso, reforça-se a necessidade de abordagens terapêuticas mais individualizadas, que integrem tanto os perfis genéticos quanto funcionais da microbiota, com o objetivo de orientar regimes antimicrobianos mais eficazes. Destaca-se ainda o potencial benefício do rastreamento de procedimentos odontológicos pré-operatórios, além do papel de inibidores de bombas de próton, dada a possível translocação de microrganismos orais. Por fim, ressalta-se a importância de estudos com maior poder amostral e análises funcionais complementares para aprofundar a compreensão desses mecanismos e embasar práticas clínicas mais precisas.

REFERÊNCIAS

- Ahmed AM, Shimamoto T. A plasmid-encoded class 1 integron carrying *sat*, a putative phosphoserine phosphatase gene and *aadA2* from enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 isolated in Japan. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jun 15;235(2):243-8
- Ahmed J, Cao H, Panteleimonitis S, Khan J, Parvaiz A. Robotic vs laparoscopic rectal surgery in high-risk patients. *Colorectal Dis*. 2017 Dec;19(12):1092-1099.
- Akgun E, Caliskan C, Bozbiyik O, Yoldas T, Sezak M, Ozkok S, *et al*. Randomized clinical trial of short or long interval between neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery for rectal cancer. *Br J Surg*. 2018;105:1417–1425.
- Akiyoshi T, Ueno M, Fukunaga Y, Nagayama S, Fujimoto Y, Konishi T, *et al*. Effect of body mass index on short-term outcomes of patients undergoing laparoscopic resection for colorectal cancer: a single institution experience in Japan. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2011;21:409–414.
- Al-Mazrou AM, Chiuzan C, Kiran RP. The robotic approach significantly reduces length of stay after colectomy: a propensity score-matched analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2017;32:1415–1421.
- Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, *et al*. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D690–D699.
- Alekseev M, Rybakov E, Shelygin Y, Chernyshov S, Zarodnyuk I. A study investigating the perfusion of colorectal anastomoses using fluorescence angiography: results of the FLAG randomized trial. *Colorectal Dis*. 2020 Sep;22(9):1147–1153.
- Alrubia S, Mao J, Chen Y, Barber J, Rostami-Hodjegan A. Altered bioavailability and pharmacokinetics in Crohn's disease: capturing systems parameters for PBPK to assist with predicting the fate of orally administered drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2022 Oct;61(10):1365-1392.
- Alrushaid N, Khan FA, Al-Suhaimi E, Elaissari A. Progress and Perspectives in Colon Cancer Pathology, Diagnosis, and Treatments. *Diseases*. 2023; 11(4):148.
- Alverdy JC, Schardey HM. Anastomotic leak: toward an understanding of its root causes. *J Gastrointest Surg*. 2021;25:2966–2975.
- Alves YPA, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg*. 2002;26:499–502.
- American Cancer Society (ACS). About colorectal cancer. Atlanta: American Cancer Society; Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/about.html>. Acesso em: 23 mar. 2025.

Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:22–32.

Araghi M, Soerjomataram I, Bardot A, Ferlay J, Cabasag CJ, Morrison DS, *et al*. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jul;4(7):511–8. Erratum in: *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug;4(8):e8.

Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, *et al*. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology*. 2020;159(1):335–349.e15.

Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr;66(4):683–691.

Arron MNN, Greijdanus NG, Ten Broek RPG, Dekker JWT, van Workum F, van Goor H, *et al*. Trends in risk factors of anastomotic leakage after colorectal cancer surgery (2011–2019): a Dutch population-based study. *Colorectal Dis*. 2021 Dec;23:3251–3261.

Artus A, Tabchouri N, Iskander O, Michot N, Muller O, Giger-Pabst U, *et al*. Long-term outcome of anastomotic leakage in patients undergoing low anterior resection for rectal cancer. *BMC Cancer*. 2020;20:780.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, *et al*.; MetaHIT Consortium. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174–180. Erratum in: *Nature*. 2011 Jun 30;474(7353):666. Erratum in: *Nature*. 2014 Feb 27;506(7489):516.

August DA, Serrano D, Poplin E. “Spontaneous,” delayed colon and rectal anastomotic complications associated with bevacizumab therapy. *J. Surg. Oncol*. 2008; 97:180–185.

Ba ZF, Yokoyama Y, Toth B, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Gender differences in small intestinal endothelial function: inhibitory role of androgens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(3):G452–G457.

Bachmann R, Leonard D, Delzenne N, Kartheuser A, Cani PD. Novel insight into the role of microbiota in colorectal surgery. *Gut*. 2017;66:738–749.

Bachmann R, Van Hul M, Baldin P, Léonard D, Delzenne NM, Belzer C, *et al*. *Akkermansia muciniphila* reduces peritonitis and improves intestinal tissue wound healing after a colonic transmural defect by a MyD88-dependent mechanism. *Cells*. 2022;11(17):2666.

Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, *et al*. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012;12:611–622.

Badr MT, Blümel B, Baumgartner S, Komp JMA, Häcker G. Antimicrobial susceptibility patterns and wild-type MIC distributions of anaerobic bacteria at a German university hospital: a five-year retrospective study (2015–2019). *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(11):823.

Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colonic cancer surgery in a nationwide audit. *Br J Surg*. 2014;101:424–432.

Bartolini I, Risaliti M, Ringressi MN, Melli F, Nannini G, Amedei A, *et al.* Role of gut microbiota-immunity axis in patients undergoing surgery for colorectal cancer: Focus on short and long-term outcomes. *World J. Gastroenterol*. 2020; 26:2498–2513.

Battersby C, Battersby N, Slade D, Soop M, Walsh C. Preoperative mechanical and oral antibiotic bowel preparation to reduce infectious complications of colorectal surgery: the need for updated guidelines. *J Hosp Infect*. 2019;101:295–299.

Bavishi C, Dupont HL. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Dec;34(11-12):1269-81.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87:245–313.

Biondo S, Parés D, Kreisler E, Ragué JM, Fraccalvieri D, Ruiz AG, *et al.* Anastomotic dehiscence after resection and primary anastomosis in left-sided colonic emergencies. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:2272–2280.

Boatman S, Kaiser T, Nalluri-Butz H, Khan MH, Dietz M, Kohn J, *et al.* Diet-induced shifts in the gut microbiota influence anastomotic healing in a murine model of colonic surgery. *Gut Microbes*. 2023;15:2283147.

Bohra M, Cwian D, Peyton C. Delayed infection in a patient after total hip arthroplasty. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2018 Aug;48(8):666.

Boström P, Haapamäki MM, Rutegård J, Matthiessen P, Rutegård M. Population-based cohort study of the impact on postoperative mortality of anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *BJS Open*. 2019;3:106–111.

Branagan G, Finnis D. Prognosis After Anastomotic Leakage in Colorectal Surgery. *Dis. Colon Rectum*. 2005; 48:1021–1026.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 742, de 10 de agosto de 2022. Dispõe sobre os critérios para a condução de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência (BD/BE) e estudos farmacocinéticos. Brasília: ANVISA; 2022. 24 p.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020 Jul;70(4):313.

Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 1957;27(4):325–49.

Brazier J, Chmelar D, Dubreuil L, Rodloff A, Sefton A, Shah H, *et al.* European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Apr;31(4):316-20.

Brown CT, Sharon I, Thomas BC, Castelle CJ, Morowitz MJ, Banfield JF. Genome-resolved analysis of a premature infant gut microbial community reveals a *Varibaculum cambriense* genome and a shift towards fermentation-based metabolism during the third week of life. *Microbiome*. 2013;1:30.

Bruggeling CE, Garza DR, Achouiti S, Mes W, Dutilh BE, Boleij A. Optimized bacterial DNA isolation method for microbiome analysis of human tissues. *MicrobiologyOpen*. 2021;00:e1191.

Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P. Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: A prospective monocentric study. *Int. J. Colorectal Dis*. 2008; 23:265–270.

Bukowska B, Grzegorowska A, Szczerkowska-Majchrzak E, Bukowski K, Kadac-Czapska K, Grembecka M, *et al.* Hazardous interactions between food, herbs, and drugs in the first stage of biotransformation: case reports of adverse drug interactions in humans. *Int J Mol Sci*. 2025 May 28;26(11):5188.

Caballero-Flores G, Pickard JM, Nunez G. Microbiota-mediated colonization resistance: mechanisms and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21:347–360.

Cakir H, Heus C, Verduin WM, Lak A, Doodeman HJ, Bemelman WA, *et al.* Visceral obesity, body mass index and risk of complications after colon cancer resection: a retrospective cohort study. *Surgery*. 2015;157:909–915.

Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012;1:39.

Caro-Quintero, A., & Konstantinidis, K. T. Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environmental Microbiology*, 2012;14(2), 347–355.

Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012 Feb;22(2):299–306.

Chang JS, Keum KC, Kim NK, Baik SH, Min BS, Huh H, *et al.* Preoperative chemoradiotherapy effects on anastomotic leakage after rectal cancer resection: a propensity score matching analysis. *Ann Surg*. 2014;259:516–521.

Chaouch MA, Kellil T, Jeddi C, Saidani A, Chebbi F, Zouari K. How to prevent anastomotic leak in colorectal surgery? A systematic review. *Ann. Coloproctol*. 2020; 36:213–222.

Chen H, Ma B, Gao P, Wang H, Song Y, Tong L, *et al.* Laparoscopic intersphincteric resection versus an open approach for low rectal cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2017;15:229.

Chen Y, Lu Y, Ke Y, Li Y. Prognostic impact of the *Fusobacterium nucleatum* status in colorectal cancers. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(35):e17221.

Chen Y, Wu N, Yan X, Kang L, Ou G, Zhou Z, *et al*. Impact of gut microbiota on colorectal anastomotic healing (Review). *Mol Clin Oncol*. 2025 Apr 14;22(6):52.

Cheng L, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. *Am. J. Clin. Oncol*. 2011; 34:573–580.

Cheng WY, Liu WX, Ding Y, Wang G, Shi Y, Chu ESH, *et al*. High sensitivity of shotgun metagenomic sequencing in colon tissue biopsy by host DNA depletion. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2023 Dec;21(6):1195–1205. Epub 2022 Sep 26.

Chiarello MM, Fransvea P, Cariati M, Adams NJ, Bianchi V, Brisinda G. Anastomotic leakage in colorectal cancer surgery. *Surg Oncol*. 2022 Mar;40:101708.

Chirivella-Fernandez A, Rivera-Castellano J, Ramírez-Caballero E, Morales-Díaz S, Delgado-Plasencia L. Folic acid deficiency as a modifiable risk factor for anastomotic leak in patients undergoing colorectal cancer surgery. *Updates Surg*. 2025 Jun 4.

Choi HK, Law WL, Ho JW. Leakage after resection and intraperitoneal anastomosis for colorectal malignancy: analysis of risk factors. *Dis Colon Rectum*. 2006;49:1719–1725.

Christley S, Shogan B, Levine Z, Koo H, Guyton K, Owens S, *et al*. Comparative genetics of *Enterococcus faecalis* intestinal tissue isolates before and after surgery in a rat model of colon anastomosis. *PLoS One*. 2020;15:e0232165.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148:1258–1270.

Collier-Hyams LS, Sloane V, Batten BC, Neish AS. Cutting edge: bacterial modulation of epithelial signaling via changes in neddylation of cullin-1. *J Immunol*. 2005;175:4194–4198.

Conde-Pérez K, Buetas E, Aja-Macaya P, Martín-De Arribas E, Iglesias-Corrás I, Trigo-Tasende N, *et al*. *Parvimonas micra* can translocate from the subgingival sulcus of the human oral cavity to colorectal adenocarcinoma. *Mol Oncol*. 2024;18(5):1143–1173.

Cong ZJ, Fu CG, Wang HT, Liu LJ, Zhang W, Wang H. Influencing factors of symptomatic anastomotic leakage after anterior resection of the rectum for cancer. *World J Surg*. 2009;33:1292–1297.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadès JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001;183(9):2888–2896.

Cucarella C, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, *et al*. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun*. 2002;70(6):3180–3186.

d'Humières C, Delavy M, Alla L, Ichou F, Gauliard E, Ghoulane A, *et al.* Perturbation and resilience of the gut microbiome up to 3 months after β -lactams exposure in healthy volunteers suggest an important role of microbial β -lactamases. *Microbiome*. 2024;12(1):50.

Dai Z, Coker OO, Nakatsu G, Wu WKK, Zhao L, Chen Z, *et al.* Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*. 2018 Apr 11;6(1):70.

Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM, Morrison RM, *et al.* Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021;371:595–602.

De Almeida CV, Taddei A, Amedei A. The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756284818783606.

De Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol Bioeng*. 1997;53(2):151–8.

De Carvalho AC, de Mattos Pereira L, Datorre JG, Dos Santos W, Berardinelli GN, Matsushita MM, *et al.* Microbiota profile and impact of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer patients of Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol*. 2019;9:813.

Denes E, Barraud O. *Fusobacterium nucleatum* infections: clinical spectrum and bacteriological features of 78 cases. *Infection*. 2016 Aug;44(4):475–81.

Doyle DJ, Goyal A, Garmon EH: American Society of Anesthesiologists Classification. StatPearls, Treasure Island, FL; 2022.

Ducarmon QR, Zwittink RD, Hornung BVH, van Schaik W, Young VB, Kuijper EJ. Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2019;83:e00007–19.

Enodien B, Maurer A, Ochs V, Bachmann M, Gripp M, Frey DM, *et al.* The effects of anastomotic leaks on the net revenue from colon surgery. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(15):9426.

FDA. Flagyl® (metronidazole) capsules, 375 mg – U.S. prescribing information. Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration; 2010. 13 p. Report No.: NDA 020334.

Fleshman JW, Branda ME, Sargent DJ, Boller AM, George V, Abbas MA, *et al.* Effect of laparoscopic-assisted resection vs open resection of stage II or III rectal cancer on pathologic outcomes. *JAMA*. 2015;314:1346–1355.

Flor-Lorente B, Noguera-Aguilar JF, Delgado-Rivilla S, García-González JM, Rodríguez-Martín M, Salinas-Ortega L, *et al.* The economic impact of anastomotic leak after colorectal cancer surgery. *Health Econ Rev*. 2023;13(1):12.

Foppa C, Ng SC, Montorsi M, Spinelli A. Anastomotic leak in colorectal cancer patients: New insights and perspectives. *Eur. J. Surg. Oncol*. 2020; 46:943–954.

Forry SP, Servetas SL, Kralj JG, Soh K, Hadjithomas M, Cano R, *et al.* Variability and bias in microbiome metagenomic sequencing: an interlaboratory study comparing experimental protocols. *Sci Rep.* 2024 Apr 29;14(1):9785.

Frank C, Sundquist J, Yu H, Hemminki A, Hemminki K. Concordant and discordant familial cancer: familial risks, proportions and population impact. *Int J Cancer.* 2017;140(7):1510–1516. doi: 10.1002/ijc.30583.

Frasson M, Granero-Castro P, Ramos Rodríguez JL, Flor-Lorente B, Braithwaite M, Martí Martínez E, *et al.* Risk factors for anastomotic leak and postoperative morbidity and mortality after elective right colectomy for cancer: results from a prospective, multicentric study of 1102 patients. *Int J Colorectal Dis.* 2016;31(1):105–114.

Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, *et al.* Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):4015–21.

Fried E, Weissman C, Sprung C. Postoperative sepsis. *Curr Opin Crit Care.* 2011;17(4):396–401.

Frontzas M, Michalopoulou V, Georgiou G, Kanata D, Matiatou M, Kimpizi D, *et al.* The impact of mechanical bowel preparation and oral antibiotics in colorectal cancer surgery (MECCA study): a prospective randomized clinical trial. *J Clin Med.* 2024;13(4):1162.

Futier E, Jaber S, Garot M, Vignaud M, Panis Y, Slim K, *et al.* Effect of oral antimicrobial prophylaxis on surgical site infection after elective colorectal surgery: multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BMJ.* 2022;379:e071476.

Gad GF, Mohamed HA, Ashour HM. Aminoglycoside resistance rates, phenotypes, and mechanisms of Gram-negative bacteria from infected patients in upper Egypt. *PLoS One.* 2011 Feb 17;6(2):e17224.

Gao XH, Yu GY, Gong HF, Liu LJ, Xu Y, Hao LQ, *et al.* Differences of protein expression profiles, KRAS and BRAF mutation, and prognosis in right-sided colon, left-sided colon and rectal cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):7882.

García-López E, Martín-Galiano AJ. The Versatility of Opportunistic Infections Caused by *Gemella* Isolates Is Supported by the Carriage of Virulence Factors From Multiple Origins. *Front Microbiol.* 2020 Mar 31;11:524.

Garfinkle R, Abou-Khalil J, Morin N, Ghitulescu G, Vasilevsky CA, Gordon P, *et al.* Is there a role for oral antibiotic preparation alone before colorectal surgery? ACS-NSQIP analysis by coarsened exact matching. *Dis Colon Rectum.* 2017;60:729–737.

Github. Biobakery workflows. 2025. Disponível em: https://github.com/biobakery/biobakery_workflows?tab=readme-ov-file#whole-metagenome-shotgun-wmgx. Acesso em: 03 fev 2025.

Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol*. 1998;28(2):383–93.

Gopalakrishnan S, Kamalanathan A, Rajan S, Menon T, Nair A, Kalyanaraman S, *et al*. Emergence of *armA* and *rmtB* genes among VIM, NDM, and IMP metallo- β -lactamase producing multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2018;65(1):107–18.

Gorissen KJ, Benning D, Berghmans T, Van Havere D, Mertens I, Van den Broeck T, *et al*. Risk of anastomotic leakage with non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal surgery. *Br. J. Surg*. 2012; 99:721–727.

Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annu Rev Pathol*. 2019 Jan 24;14:319–338.

Guan L, Liu R. The role of diet and gut microbiota interactions in metabolic homeostasis. *Adv Biol (Weinh)*. 2023;7:e2300100.

Güenaga KF, Matos D, Wille-Jørgensen P. Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;9:CD001544.

Guffey AA, Loll PJ. Regulation of resistance in vancomycin-resistant enterococci: the VanRS two-component system. *Microorganisms*. 2021;9:2026.

Guo MY, Liu J, Balmes P, Yanta C, Motamedi A, Phang PT. Effects of diet and antibiotics on anastomotic healing: a mouse model study with varied dietary fiber and fat, and pre-operative antibiotics. *Am J Surg*. 2024;235:115766.

Guyton K, Alverdy JC. The gut microbiota and gastrointestinal surgery. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 14:43–54.

Hajjar R, Gonzalez E, Fragoso G, Olierio M, Alaoui AA, Calvé A, *et al*. Gut microbiota influence anastomotic healing in colorectal cancer surgery through modulation of mucosal proinflammatory cytokines. *Gut*. 2023;72:1143–1154.

Hamabe A, Ito M, Nishigori H, Nishizawa Y, Sasaki T. Preventive effect of diverting stoma on anastomotic leakage after laparoscopic low anterior resection with double stapling technique reconstruction applied based on risk stratification. *Asian J Endosc Surg*. 2018;11:220–226.

Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):243–254.

Handelsman, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004;68(4), 669–685.

Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer – a systematic review. *Dan Med J*. 2012 Jun;59(6):A4444.

Hansen R, Balachandran R, Valsamidis TN, Iversen LH. The role of preoperative mechanical bowel preparation and oral antibiotics in prevention of anastomotic leakage following restorative resection for primary rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2023;38:129.

Harrell L, Wang Y, Antonopoulos D, Young V, Lichtenstein L, Huang Y, *et al.* Standard colonic lavage alters the natural state of mucosal-associated microbiota in the human colon. *PLoS One.* 2012;7:e32545.

Hatton GB, Madla CM, Rabbie SC, Basit AW. Gut reaction: impact of systemic diseases on gastrointestinal physiology and drug absorption. *Drug Discov Today.* 2019 Feb;24(2):417-427.

Hayase E, Jenq RR. Role of the intestinal microbiome and microbial-derived metabolites in immune checkpoint blockade immunotherapy of cancer. *Genome Med.* 2021;13:107.

Hedrick TL, Kane W. Management of acute anastomotic leaks. *Clin Colon Rectal Surg.* 2021;34(6):400–405.

Hernández-González PI, Barquín J, Ortega-Ferrete A, Patón V, Ponce-Alonso M, Romero-Hernández B, *et al.* Anastomotic leak in colorectal cancer surgery: contribution of gut microbiota and prediction approaches. *Colorectal Dis.* 2023;25:2187–2197.

Ho D, Ang G, Er C, Yap SF, Meyyur Aravamudan V. An unusual presentation of *Parvimonas micra* infective endocarditis. *Cureus.* 2018 Oct 13;10(10):e3447.

Holte K, Andersen J, Hjort Jakobsen D, Kehlet H. Cyclo-oxygenase 2 inhibitors and the risk of anastomotic leakage after fast-track colonic surgery. *Br. J. Surg.* 2009; 96:650–654.

Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenin 4, produced by mouse Paneth cells, is secreted into the gut lumen and has bactericidal activity. *Nat Immunol.* 2003;4(3):269–273.

Horiuchi A, Kokubu E, Warita T, Ishihara K. Synergistic biofilm formation by *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum*. *Anaerobe.* 2020 Apr;62:102100.

Hsu YJ, Yu ZH, Jong BK, You JF, Yu YL, Liao CK, *et al.* Short- and long-term outcomes of minimally invasive vs open pelvic exenteration in rectal tumours: a focused meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2025;40(1):86.

Hu MH, Huang RK, Zhao RS, Yang KL, Wang H. Does neoadjuvant therapy increase the incidence of anastomotic leakage after anterior resection for mid and low rectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis.* 2017;19:16–26.

Huang Y, Tang SR, Young CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a meta-analysis. *ANZ J. Surg.* 2018; 88:959–965.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486:207–214.

Huttenhower. Kneaddata. 2025. Disponível em: <https://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata/>. Acesso em: 03 fev. 2025.

Hyman N, Manchester TL, Osler T, Burns B, Cataldo PA. Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Ann Surg*. 2007;245:254–258.

Hyoju SK, Adriaansens C, Wienholts K, Sharma A, Keskey R, Arnold W, *et al*. Low-fat/high-fibre diet prehabilitation improves anastomotic healing via the microbiome: an experimental model. *Br J Surg*. 2020;107:743–755.

INCA. Câncer de intestino. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>. Acesso em: 23 abr. 2021.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *Colorectal Cancer – Globocan*. Lyon: IARC; 2025a. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en>. Acesso em: 23 jan. 2025.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *Globocan Fact Sheet: Colorectal Cancer*. Lyon: IARC; 2025b. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/8-colon-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2025.

Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal cancer: from risk factors to oncogenesis. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(9):1646.

Jackson MA, Goodrich JK, Maxan ME, Freedberg DE, Abrams JA, Poole AC, *et al*. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut*. 2016;65(5):749–56.

Jalanka J, Salonen A, Salojärvi J, Ritari J, Immonen O, Marciari L, *et al*. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut*. 2015;64:1562–1568.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol*. 2015; 21:8836–8847.

Jannasch O, Klinge T, Otto R, Ptok H, Wolff S, Hachenberg T, *et al*. Risk factors, short and long term outcome of anastomotic leaks in rectal cancer. *Oncotarget*. 2015;6:36884–36893.

Jayne DG, Thorpe HC, Copeland J, Quirke P, Brown JM, Guillou PJ. Five-year follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of laparoscopically assisted versus open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2010;97:1638–1645.

Jian H, Liu Y, Wang X, Dong X, Zou X. *Akkermansia muciniphila* as a next-generation probiotic in modulating human metabolic homeostasis and disease progression: a role mediated by gut-liver-brain axes? *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3900.

Jiang SS, Xie YL, Xiao XY, Kang ZR, Lin XL, Zhang L, *et al*. *Fusobacterium nucleatum*-derived succinic acid induces tumor resistance to immunotherapy in colorectal cancer. *Cell Host Microbe*. 2023 May 10;31(5):781–797.e9.

Jones C, Badger SA, Hannon R. The role of carbohydrate drinks in pre-operative nutrition for elective colorectal surgery. *Ann R Coll Surg Engl*. 2011;93:504–507.

Jørgensen AB, Almer L, Samaniego Castruita JA, Pedersen MS, Kirkby NS, Jensen EA, *et al.* The baseline fecal microbiome differs in patients with and without anastomotic leakage after colorectal cancer surgery. *Heliyon*. 2024 Nov 22;10(23):e40616.

Jung SH, Yu CS, Choi PW, Kim DD, Park IJ, Kim HC, *et al.* Risk factors and oncologic impact of anastomotic leakage after rectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum*. 2008;51:902–908.

Kambayashi A, Shirasaka Y. Food effects on gastrointestinal physiology and drug absorption. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2023 Feb;48:100488.

Kang CY, Halabi WJ, Chaudhry OO, Nguyen V, Pigazzi A, Carmichael JC, *et al.* Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *JAMA Surg*. 2013;148:65–71.

Kang J, Kim H, Park H, Lee B, Lee KY. Risk factors and economic burden of postoperative anastomotic leakage-related events in patients who underwent surgeries for colorectal cancer. *PLoS One*. 2022;17(5):e0267950.

Kang SB, Park JW, Jeong SY, Nam BH, Choi HS, Kim DW, *et al.* Open versus laparoscopic surgery for mid or low rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy (COREAN trial): short-term outcomes of an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:637–645.

Katsowich N, Elbaz N, Pal RR, *et al.* Host cell attachment elicits posttranscriptional regulation in infecting enteropathogenic bacteria. *Science*. 2017;355:735–739.

Kaźmierczak-Siedlecka K, Daca A, Fic M, Van de Wetering T, Folwarski M, Makarewicz W. Therapeutic methods of gut microbiota modification in colorectal cancer management—fecal microbiota transplantation, prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Gut Microbes* 2020; 11:1518–1530.

Kiran RP, Murray ACA, Chiuzan C, Estrada D, Forde K. Combined preoperative mechanical bowel preparation with oral antibiotics significantly reduces surgical site infection, anastomotic leak, and ileus after colorectal surgery. *Ann Surg*. 2015;262:416–425.

Klein M, Gögenur I, Rosenberg J. Postoperative use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with anastomotic leakage requiring reoperation after colorectal resection: Cohort study based on prospective data. *BMJ* 2012; 345:1–13.

Klünemann M, Andrejev S, Blasche S, Mateus A, Phapale P, Devendran S, *et al.* Bioaccumulation of therapeutic drugs by human gut bacteria. *Nature*. 2021 Sep;597(7877):533–538.

Ko JH, Baek JY, Kang CI, Lee WJ, Lee JY, Cho SY, *et al.* Bacteremic meningitis caused by *Parvimonas micra* in an immunocompetent host. *Anaerobe*. 2015 Aug;34:161–163.

Komen N, Sliker J, Willemsen P, Mannaerts G, Pattyn P, Karsten T, *et al.* Polymerase chain reaction for *Enterococcus faecalis* in drain fluid: the first screening test for symptomatic colorectal anastomotic leakage. The Appeal-study: analysis of parameters predictive for evident anastomotic leakage. *Int J Colorectal Dis*. 2014;29:15–21.

Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Risk factors for anastomotic leakage after surgery for colorectal cancer: results of prospective surveillance. *J Am Coll Surg*. 2006; 202:439–444.

Koppel N, Maini RV, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 2017 Jun 23;356(6344):eaag2770.

Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, *et al*. A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Comput Biol*. 2013;9:e1002863.

Kornmann VNN, Treskes N, Hoonhout LHF, Bollen TL, van Ramshorst B, Boerma D. Systematic review on the value of CT scanning in the diagnosis of anastomotic leakage after colorectal surgery. *Int J Colorectal Dis*. 2012;28:437–445.

Koskenvuo L, Lehtonen T, Koskensalo S, Rasilainen S, Klintrup K, Ehrlich A, *et al*. Mechanical and oral antibiotic bowel preparation versus no bowel preparation in right and left colectomy: subgroup analysis of MOBILE trial. *BJS Open*. 2021;5:zrab011.

Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, *et al*. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):207–215.

Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3249–3256.

Krørup PM, Jørgensen LN, Andreasen AH, Harling H. A nationwide study on anastomotic leakage after colonic cancer surgery. *Colorectal Dis*. 2012;14:e661–e667.

Krysa J, Patel V, Taylor J, Williams AB, Carapeti E, George ML. Outcome of patients on renal replacement therapy after colorectal surgery. *Dis Colon Rectum*. 2008;51:961–965.

Kube R, Mroczkowski P, Granowitz A, Benedix F, Gastinger I, Lippert H. Anastomotic leakage after colon cancer surgery: a predictor of significant morbidity and hospital mortality, and diminished tumour-free survival. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(6):661–669.

Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Kwon YM, Hanson JM, Neish AS. The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J Immunol*. 2009;182:538–546.

Kwag SJ, Kim JG, Kang WK, Lee JK, Oh ST. Nutritional risk is an independent factor for postoperative morbidity in surgery for colorectal cancer. *Ann Surg Treat Res*. 2014;86:206–211.

Kwak HD, Kim SH, Kang DW, Baek SJ, Kwak JM, Kim J. Risk factors and oncologic outcomes of anastomosis leakage after laparoscopic right colectomy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2017;27:440–444.

La Regina D, Di Giuseppe M, Lucchelli M, Saporito A, Lancia M, Mongelli F, *et al*. Financial Impact of Anastomotic Leakage in Colorectal Surgery. *J. Gastrointest. Surg*. 2019; 23:580–586.

Lago V, Fotopoulou C, Chiantera V, Minig L, Gil-Moreno A, Cascales-Campos P, *et al.* Risk factors for anastomotic leakage after colorectal resection in ovarian cancer surgery: a multi-centre study. *Gynecol Oncol.* 2019;153:549–554.

Lamaudiere MTF, Arasaradnam R, Weedall GD, Morozov IY. The colorectal cancer microbiota alter their transcriptome to adapt to the acidity, reactive oxygen species, and metabolite availability of gut microenvironments. *mSphere.* 2023;8(2):e00010-23.

Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet.* 1999;36(5):353–73.

Lance GN, Williams WT. A General Theory of Classificatory Sorting Strategies 1. Hierarchical Systems. *Comput. J.* 1967; 9(4):373–380.

Lande R. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. *Oikos.* 1996; 76(1):5.

Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Dig Dis.* 2016;34(3):260–268.

Lauka L, Reitano E, Carra MC, Spinelli A, Gallo G, Clerico G, *et al.* Role of the intestinal microbiome in colorectal cancer surgery outcomes. *World J. Surg. Oncol.* 2019; 17:204.

Law WI, Chu KW, Ho JW, Chan CW. Risk factors for anastomotic leakage after low anterior resection with total mesorectal excision. *Am J Surg.* 2000;179(2):92–96.

Lawrence JG. Shared strategies in gene organization among prokaryotes and eukaryotes. *Cell.* 2002 Aug 23;110(4):407-13.

Lee JH, Ahn BK, Ryu J, Lee KH. Mechanical bowel preparation combined with oral antibiotics in colorectal cancer surgery: a nationwide population-based study. *Int J Colorectal Dis.* 2021;36:1929–1935.

Lehr K, Lange UG, Hipler NM, Vilchez-Vargas R, Hoffmeister A, Feisthammel J, *et al.* Prediction of anastomotic insufficiency based on the mucosal microbiome prior to colorectal surgery: a proof-of-principle study. *Sci Rep.* 2024;14:15335.

Leiros HK, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem.* 2004;279(53):55840–9.

Lemmens L, Claes V, Uzzell M. Managing patients with metastatic colorectal cancer on bevacizumab. *Br. J. Nurs.* 2008; 17:944–949.

Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in Apoe^{-/-} mice. *Circulation.* 2016;133(24):2434–2446.

Li X, Zhang S, Guo G, Han J, Yu J. Gut microbiome in modulating immune checkpoint inhibitors. *EBioMedicine.* 2022;82:104163.

Liao K, Wen J, Liu Z, Zhang B, Zhang X, Fu Y, *et al.* The role of intratumoral microbiome in the occurrence, proliferation, metastasis of colorectal cancer and its underlying therapeutic strategies. *Ageing Res Rev.* 2025 Jul 8:102820.

Lin D, Koskella B, Lin HC, Harrison F, Li B, Fu X, *et al.* Contribution of biofilm formation genetic locus, *pgaABCD*, to antibiotic resistance development in gut microbiome. *Gut Microbes.* 2020;12(1):1–12.

Lin JK, Yueh TC, Chang SC, Lin CC, Lan YT, Wang HS, *et al.* The influence of fecal diversion and anastomotic leakage on survival after resection of rectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2011 Dec;15:2251–2261.

Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg.* 2006;76:579–585.

Litvak Y, Byndloss MX, Bäumler AJ. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science.* 2018;362:eaat9076.

Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, *et al.* Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis.* 2011a;52:e18–e55.

Liu JH, Yue T, Luo ZW, Cao J, Yan ZQ, Jin L, *et al.* *Akkermansia muciniphila* promotes type H vessel formation and bone fracture healing by reducing gut permeability and inflammation. *Dis Model Mech.* 2020;13(11):dmm043620.

Liu X, Chen Y, Zhang S, Dong L. Gut microbiota-mediated immunomodulation in tumor. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40:221.

Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, *et al.* Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery—a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011b;33:50–63.

Liu Z, Yang M, Zhao ZX, Guan X, Jiang Z, Chen HP, *et al.* Current practice patterns of preoperative bowel preparation in colorectal surgery: a nation-wide survey by the Chinese Society of Colorectal Cancer. *World J Surg Oncol.* 2018;16:134.

Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):1253–6.

Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017;19:29–41.

Löwenmark T, Löfgren-Burström A, Zingmark C, Eklöf V, Dahlberg M, Wai SN, *et al.* *Parvimonas micra* as a putative non-invasive faecal biomarker for colorectal cancer. *Sci Rep.* 2020;10:15250.

Löwenmark T, Löfgren-Burström A, Zingmark C, Ljuslinder I, Dahlberg M, Edin S, *et al.* Tumor colonization of *Parvimonas micra* is associated with decreased survival in colorectal cancer patients. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5937.

Lu D, Kalantar KL, Chu VT, Glascock AL, Guerrero ES, Bernick N, *et al.* Simultaneous detection of pathogens and antimicrobial resistance genes with the open source, cloud-based, CZ ID pipeline. *Genome Med*. 2025a May 6;17(1):46.

Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput. Sci.* 2017; 3:e104.

Lu J, Rincon N, Wood DE, Breitwieser FP, Pockrandt C, Langmead B, *et al.* Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc*. 2022a Dec;17(12):2815–2839. Erratum in: *Nat Protoc*. 2024 Aug 29.

Lu SSM, Rutegård M, Häggström C, Gylfe Å, Harlid S, Van Guelpen B. Prior antibiotics exposure is associated with an elevated risk of surgical site infections, including anastomotic leakage, after colon cancer but not rectal cancer surgery: a register-based study of 38,839 patients. *Int J Cancer*. 2025b;156(9):1703–1715.

Lu Y, Zhang Y, Xu J, Chen S, Xie J, Wang W, *et al.* Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol*. 2022b;15:47.

Ma B, Gao P, Wang H, Xu Q, Song Y, Huang X, *et al.* What has preoperative radio(chemo)therapy brought to localized rectal cancer patients in terms of perioperative and long-term outcomes over the past decades? A systematic review and meta-analysis based on 41,121 patients. *Int J Cancer*. 2017;141:1052–1065.

Maatouk MA, Akid A, Kbir GH, Mabrouk A, Selmi M, Ben Dhaou A, *et al.* Is there a role for mechanical and oral antibiotic bowel preparation for patients undergoing minimally invasive colorectal surgery? A systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2023;27:1011–1025.

Machida E, Miyakura Y, Takahashi J, Tamaki S, Ishikawa H, Hasegawa F, *et al.* Bevacizumab is associated with delayed anastomotic leak after low anterior resection with preoperative radiotherapy for rectal cancer: a case report. *Surg Case Rep*. 2019;5:14.

Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*. 2005 Feb;105(2):477–498.

Magurran AE. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell Publishing; 2004.

Mäkelä JT, Kiviniemi H, Laitinen S. Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:653–660.

Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, *et al.* Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. *PLoS Comput. Biol.* 2021 Nov;16;17(11):e1009442.

Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55:205–211.

Manor O, Dai CL, Kornilov SA, Smith B, Price ND, Lovejoy JC, *et al.* Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun*. 2020 Oct 15;11(1):5206

Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz GL, Mégraud F. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol*. 2003;154(2):137–46.

Marotz CA, Sanders JG, Zuniga C, Zaramela LS, Knight R, Zengler K. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion. *Microbiome*. 2018 Feb 27;6(1):42.

Martínez-Pérez A, Carra MC, Brunetti F, De'Angelis N. Short-term clinical outcomes of laparoscopic vs open rectal excision for rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2017;23:7906–7916.

McCulloch JA, Davar D, Rodrigues RR, Khan MAW, Dai A, Docimo S, *et al.* Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nat Med*. 2022;28:545–556.

McDermott FD, Heeney A, Kelly ME, Steele RJ, Carlson GL, Winter DC. Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *Br J Surg*. 2015;102(5):462–479.

McLaren MR, Willis AD, Callahan BJ. Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments. *Elife*. 2019;8:e46923.

Midura EF, Hanseman D, Davis BR, Atkinson SJ, Abbott DE, Shah SA, *et al.* Risk factors and consequences of anastomotic leak after colectomy: a national analysis. *Dis Colon Rectum*. 2015;58:333–338.

Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. 2016;65(12):1973–80.

Mima K, Sakamoto Y, Kosumi K, Ogata Y, Miyake K, Hiyoshi Y, *et al.* Mucosal cancer-associated microbes and anastomotic leakage after resection of colorectal carcinoma. *Surg Oncol*. 2020;32:63–68.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(4):727–737.

Mizuta M, Endo I, Yamamoto S, Inokawa H, Kubo M, Udaka T, *et al.* Perioperative supplementation with bifidobacteria improves postoperative nutritional recovery, inflammatory response, and fecal microbiota in patients undergoing colorectal surgery: a prospective, randomized clinical trial. *Biosci Microbiota Food Health*. 2016;35:77–87.

Moghadamyeghaneh Z, Hanna MH, Carmichael JC, Mills SD, Pigazzi A, Nguyen NT, *et al.* Nationwide analysis of outcomes of bowel preparation in colon surgery. *J Am Coll Surg.* 2015;220:912–920.

Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, *et al.* Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut.* 2023; 72(2):338–344.

Morks AN, Ploeg RJ, Hofker HS, Wiggers T, Havenga K. Late anastomotic leakage in colorectal surgery: a significant problem. *Colorectal Dis.* 2013;15:e271–e275.

Morris MS, Graham LA, Chu DI, Cannon JA, Hawn MT. Oral antibiotic bowel preparation significantly reduces surgical site infection rates and readmission rates in elective colorectal surgery. *Ann Surg.* 2015;261:1034–1040.

Morton JT, Marotz C, Washburne A, Silverman J, Zaramela LS, Edlund A, *et al.* Establishing microbial composition measurement standards with reference frames. *Nature Communications*, 2019;10(1), 2719.

Mulita F, Liolis E, Akinosoglou K, Tchabashvili L, Maroulis I, Kaplanis C, *et al.* Postoperative sepsis after colorectal surgery: a prospective single-center observational study and review of the literature. *Prz Gastroenterol.* 2022;17(1):47–51.

Munier AL, Stabler RA, Ferraro MJ, Robicsek A, Krebs J, Morrissey I, *et al.* Comparative dynamics of the emergence of fluoroquinolone resistance in staphylococci from the nasal microbiota of patients treated with fluoroquinolones according to their environment. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:653–659.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2).

Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jan;11(1):81-120.

Nalluri-Butz H, Bobel MC, Nugent J, Boatman S, Emanuelson R, Melton-Meaux G, *et al.* A pilot study demonstrating the impact of surgical bowel preparation on intestinal microbiota composition following colon and rectal surgery. *Sci Rep.* 2022;12(1):10559.

National Cancer Institute (EUA). SEER Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute; Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>. Acesso em: 05 set 2025.

Nayfach, S., & Pollard, K. S. Toward Accurate and Quantitative Comparative Metagenomics. *Cell*, 2016;166(5), 1103–1116

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Acesso em: 13 jul 2025.

Nearing JT, Comeau AM, Langille MGI. Identifying biases and their potential solutions in human microbiome studies. *Microbiome.* 2021; 9(1):113.

Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, *et al.* Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nat Commun.* 2022;13(1):342. Erratum in: *Nat Commun.* 2022;13(1):777.

Neo Química. Metronidazol 250 mg – comprimido revestido [bula de medicamento na internet]. Anápolis (GO): Neo Química; c2020. Disponível em: https://img.drogasil.com.br/raiadrogasil_bula/Metronidazol250mgNeoQuimica.pdf. Acesso em: 10 jul 2025.

Ng SSM, Lee JFY, Yiu RYC, Li JCM, Hon SSF, Mak TWC, *et al.* Laparoscopic-assisted versus open total mesorectal excision with anal sphincter preservation for mid and low rectal cancer: a prospective, randomized trial. *Surg Endosc.* 2013;28:297–306.

Nijssen DJ, Wienholts K, Postma MJ, Tuynman J, Bemelman WA, Laméris W, *et al.* The economic impact of anastomotic leakage after colorectal surgery: a systematic review. *Tech Coloproctol.* 2024;28(1):55.

Nikolian VC, Kamdar NS, Regenbogen SE, Morris AM, Byrn JC, Suwanabol PA, *et al.* Anastomotic leak after colorectal resection: a population-based study of risk factors and hospital variation. *Surgery.* 2017;161:1619–1627.

Novick A, Doolittle WF. How microbes “jeopardize” the modern synthesis. *PLOS Genetics.* 2019;15(4), e1008166.

Nugent TS, Kelly ME, Donlon NE, Fahy MR, Larkin JO, McCormick PH, *et al.* Obesity and anastomotic leak rates in colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2021;36(9):1819–1829.

O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006; 7:688–693.

Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 2000;405:299–304.

Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi T, Nomoto K, Onodera H. Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2013;17:1657–1664.

Olivas AD, Shogan BD, Valuckaite V, Zaborin A, Belogortseva N, Musch M, *et al.* Intestinal tissues induce an SNP mutation in *Pseudomonas aeruginosa* that enhances its virulence: possible role in anastomotic leak. *PLoS One.* 2012;7(8):e44326.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Diretrizes globais para a prevenção de infecção de sítio cirúrgico. Genebra: OMS; Apêndice 6, Resumo de uma revisão sistemática sobre preparo intestinal mecânico e uso de antibióticos orais. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536423/> Acesso em: 20 jun. 2025.

Osman MA, Neoh HM, Ab Mutalib NS, Chin SF, Mazlan L, Raja Ali RA, *et al.* *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* as a four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. *Sci Rep.* 2021;11:2925.

Paliogiannis P, Deidda S, Maslyankov S, Saba L, Chatzikiyriakidou Y, Paycheva M, *et al.* Blood cell count indexes as predictors of anastomotic leakage in elective colorectal surgery: A multicenter study on 1432 patients. *World J. Surg. Oncol.* 2020; 18:1–8.

Palmisano S, Campisciano G, Iacuzzo C, Bonadio L, Zucca A, Cosola D, *et al.* Role of preoperative gut microbiota on colorectal anastomotic leakage: preliminary results. *Updates Surg.* 2020;72(4):1013–1022.

Park JS, Choi GS, Kim SH, Kim HR, Kim NK, Lee KY, *et al.* Multicenter analysis of risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic rectal cancer excision: the Korean laparoscopic colorectal surgery study group. *Ann Surg.* 2013;257:665–671.

Peng Y, Hu Y, Li B, Ma L, Luo Y, Zhang T, *et al.* Role of gut microbiota in travel-related acquisition of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Travel Med.* 2021;28:taab022.

Penna M, Hompes R, Arnold S, Wynn G, Austin R, Warusavitarne J, *et al.* Incidence and risk factors for anastomotic failure in 1594 patients treated by transanal total mesorectal excision. *Ann Surg.* 2019;269:700–711.

Pereira-Marques J, Hout A, Ferreira RM, Weber M, Pinto-Ribeiro I, van Doorn LJ, *et al.* Impact of host DNA and sequencing depth on the taxonomic resolution of whole metagenome sequencing for microbiome analysis. *Front Microbiol.* 2019 Jun 12;10:1277.

Persidis A. The business of pharmacogenomics. *Nat Biotechnol.* 1998 Feb;16(2):209–210.

Piccinno G, Thompson KN, Manghi P, Ghazi AR, Thomas AM, Blanco-Míguez A, *et al.* Pooled analysis of 3,741 stool metagenomes from 18 cohorts for cross-stage and strain-level reproducible microbial biomarkers of colorectal cancer. *Nat Med.* 2025 Jul;31(7):2416–2429.

Piewngam P, Sun Y, Zheng Y, Ngamskulrungroj P, Khongthong S, Naenrangsee S, *et al.* Composition of the intestinal microbiota in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae carriers and non-carriers in Thailand. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53:435–441.

Pilmis B, Israel J, Le Monnier A, Mizrahi A. Spondylodiscitis due to anaerobic bacteria: about a case of *Parvimonas micra* infection. *Anaerobe.* 2015 Aug;34:156–157.

Pommergaard HC, Gessler B, Burcharth J, Angenete E, Haglind E, Rosenberg J. Preoperative risk factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Color. Dis.* 2014; 16:662–671.

Prabhakaran S, Prabhakaran S, Lim WM, Guerra G, Heriot AG, Kong JC. Anastomotic leak in colorectal surgery: predictive factors and survival. *Pol Przegl Chir.* 2022 Dec 20;95(5):56–64.

Pumbwe L, Skilbeck C, Wexler H. Overexpression of RecA protein in *Bacteroides fragilis* increases resistance to metronidazole and other DNA-damaging agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1381–6.

Qin C, Ren X, Xu K, Chen Z, He Y, Song X. Does preoperative radio(chemo)therapy increase anastomotic leakage in rectal cancer surgery? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:910956.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, *et al*. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59–65.

Qin Q, Ma T, Deng Y, Zheng J, Zhou Z, Wang H, *et al*. Impact of preoperative radiotherapy on anastomotic leakage and stenosis after rectal cancer resection: post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Dis Colon Rectum*. 2016;59(10):934–942.

Qu R, Ma Y, Tao L, Bao X, Zhou X, Wang B, *et al*. Features of colorectal cancer in China stratified by anatomic sites: a hospital-based study conducted in university-affiliated hospitals from 2014 to 2018. *Chin J Cancer Res*. 2021 Aug 31;33(4):500–511.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

Ramakrishna BS. The Normal Bacterial Flora of the Human Intestine and Its Regulation. *J. Clin. Gastroenterol*. 2007; 41:S2–S6.

Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010 Dec;13(6):151–171.

Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(1):1–6.

Reinhardt C. Gut microbiota ndash architects of small intestinal capillaries. *Front. Biosci*. 2018; 23:4614.

Reischl S, Wilhelm D, Friess H, Neumann PA. Innovative approaches for induction of gastrointestinal anastomotic healing: an update on experimental and clinical aspects. *Langenbecks Arch Surg*. 2021;406(4):971–980.

Rencuzogullari A, Benlice C, Valente M, Abbas MA, Remzi FH, Gorgun E. Predictors of anastomotic leak in elderly patients after colectomy: nomogram-based assessment from the American College of Surgeons National Surgical Quality Program procedure-targeted cohort. *Dis Colon Rectum*. 2017;60:527–536.

Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, Ottman N, Belzer C, Huhtinen H, *et al*. *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:3655–3662.

Reysset G. Genetics of 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* species. *Anaerobe*. 1996;2(2):59–69.

Riley SA, Sutcliffe F, Kim M, Kapas M, Rowland M, Turnberg LA. The influence of gastrointestinal transit on drug absorption in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 1992 Jul;34(1):32–9.

Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol.* 2016;7:185.

Roche. Avastin (Bevacizumab) summary of product characteristics (European Medicines Agency). Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avastin-epar-product-information_en.pdf. Acesso em: 23 abr. 2021.

Rodriguez C, de Prost N, Fourati S, Lamoureux C, Gricourt G, N'debi M, *et al.* Viral genomic, metagenomic and human transcriptomic characterization and prediction of the clinical forms of COVID-19. *PLOS Pathogens*, 2021;17(3), e1009416.

Rolandelli RH, Buckmire MA, Bernstein KA. Intravenous butyrate and healing of colonic anastomoses in the rat. *Dis Colon Rectum.* 1997;40:67–70.

Rollins KE, Javanmard-Emamghissi H, Acheson AG, Lobo DN. The Role of Oral Antibiotic Preparation in Elective Colorectal Surgery: A Meta-analysis. *Ann. Surg.* 2019; 270:43–58.

Rosenberg E. Diversity of bacteria within the human gut and its contribution to the functional unity of holobionts. *npj Biofilms Microbiomes.* 2024;10:134.

Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, Han RP, Raab WJ, Sahoo D, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/beta-catenin modulator Annexin A1. *EMBO Rep.* 2019;20(8):e47638.

Russo E, Taddei A, Ringressi MN, Ricci F, Amedei A. The interplay between the microbiome and the adaptive immune response in cancer development. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2016; 9:594–605.

Rutegård M, Norrgård I, Moshtaghi-Svensson J, Hagström J, Myrberg IH, Lantz A, *et al.* Exposure to androgen deprivation therapy and risk of anastomotic leakage after colorectal cancer surgery. *Colorectal Dis.* 2025;27(6):e70126.

Saad R, Rizkallah MR, Aziz RK. Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. *Gut Pathog.* 2012 Nov 30;4(1):16.

Saffarian A, Mulet C, Regnault B, Amiot A, Tran-Van-Nhieu J, Ravel J, *et al.* Crypt- and mucosa-associated core microbiotas in humans and their alteration in colon cancer patients. *mBio.* 2019;10(4):e01315-19.

Saishoji Y, Mori K, Izumi Y. Sternoclavicular septic arthritis caused by *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum* infection with intra-articular corticosteroid administration. *Intern Med.* 2024 Jan 15;63(2):341–4.

Saito T, Karasawa H, Ouchi K, Ono T, Kajiwarra T, Kohyama A, *et al.* Characteristics of gut microbiota in high-methylated colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2025 Jun 16.

Sawai T, Koga S, Ide S, Yoshioka S, Matsuo N, Mukae H. An iliopsoas abscess caused by *Parvimonas micra*: a case report. *J Med Case Rep.* 2019 Mar 1;13(1):47.

Scarborough JE, Mantyh CR, Sun Z, Migaly J. Combined mechanical and oral antibiotic bowel preparation reduces incisional surgical site infection and anastomotic leak rates after elective colorectal resection: an analysis of colectomy-targeted ACS NSQIP. *Ann Surg.* 2015;262:331–337.

Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, *et al.* The multidrug-resistant human pathogen *Clostridioides difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet.* 2006;38(7):779–86.

Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, *et al.* Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012;13:R42.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(11):1348–1361.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016 Aug 19;14(8):e1002533

Sevillano G, Miño APY, Solís MB, Vaca JP, Zurita-Salinas C, Zurita J. First report of antibiotic resistance markers *cfiA* and *nim* among *Bacteroides fragilis* group strains in Ecuadorian patients. *Microb Drug Resist.* 2023;29(5):533–539.

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993 Mar;57(1):138–163.

Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* 2017; 4:14.

Shi S, Liu Y, Wang Z, Jin X, Yan W, Guo X, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* induces colon anastomosis leak by activating epithelial cells to express MMP9. *Front Microbiol.* 2022;13:1031882.

Shogan BD, Belogortseva N, Luong PM, Zaborin A, Lax S, Bethel C, *et al.* Collagen degradation and MMP9 activation by *Enterococcus faecalis* contribute to intestinal anastomotic leak. *Sci Transl Med.* 2015;7:286ra68.

Shogan BD, Carlisle EM, Alverdy JC, Umanskiy K. Do we really know why colorectal anastomoses leak? *J Gastrointest Surg.* 2013;17:1698–1707.

Shogan BD, Smith DP, Christley S, Gilbert JA, Zaborina O, Alverdy JC. Intestinal anastomotic injury alters spatially defined microbiome composition and function. *Microbiome.* 2014;2:35.

Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 2020; 70:145–164.

Slieker JC, Komen N, Mannaerts GH, Karsten TM, Willemsen P, Murawska M, *et al.* Long-term and perioperative corticosteroids in anastomotic leakage: a prospective study of 259 left-sided colorectal anastomoses. *Arch Surg.* 2012;147:447–452.

Slim K, Vicaut E, Launay-Savary MV, Contant C, Chipponi J. Updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials on the role of mechanical bowel preparation before colorectal surgery. *Ann Surg.* 2009;249:203–209.

Sninsky JA, Shore BM, Lupu GV, Crockett SD. Risk factors for colorectal polyps and cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2022 Apr;32(2):195–213.

Solanki S, Das HK. Antimicrobial resistance: Molecular drivers and underlying mechanisms. *J Med Surg Public Health.* 2024;3:100122.

Sorensen LT, Hemmingsen U, Kallehave F, Wille-Jørgensen P, Kjaergaard J, Møller LN, *et al.* Risk factors for tissue and wound complications in gastrointestinal surgery. *Ann Surg.* 2005;241:654–658.

Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med.* 2001 May;7(5):201–204.

Sripathi S, Khan MI, Patel N, Meda RT, Nuguru SP, Rachakonda S. Factors contributing to anastomotic leakage following colorectal surgery: why, when, and who leaks? *Cureus.* 2022 Oct 5;14(10):e29964.

Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15451–15455.

Stevenson ARL, Solomon M, Lumley JW, Hewett P, Clouston A, Gebiski V, *et al.* Effect of laparoscopic-assisted resection vs open resection on pathological outcomes in rectal cancer: the ALaCaRT randomized clinical trial. *JAMA.* 2015;314:1356–1363.

Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol.* 2003;185(5):1485–91.

Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998–2001. *Cancer.* 2006 Sep 1;107:1128–1141.

Stillhart C, Vučićević K, Augustijns P, Basit AW, Batchelor H, Flanagan TR, *et al.* Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations--An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci.* 2020 Apr 30;147:105280.

Stoll T, Stucki G, Brühlmann P, Vogt M, Gschwend N, Michel BA. Infection of a total knee joint prosthesis by *Peptostreptococcus micros* and *Propionibacterium acnes* in an elderly RA patient: implant salvage with long-term antibiotics and needle aspiration/irrigation. *Clin Rheumatol.* 1996 Jul;15(4):399–402.

Stoodley P, de Beer D, Lewandowski Z. Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(8):2711–6.

Sung H, Siegel RL, Rosenberg PS, Jemal A. Emerging cancer trends among young adults in the USA: analysis of a population-based cancer registry. *Lancet Public Health.* 2019;4(3):e137-e147.

Takiishi T, Fenero CIM, Camara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* 2017;5:e1373208.

Telem DA, Chin EH, Nguyen SQ, Divino CM. Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery: a case-control study. *Arch Surg*. 2010;145:371–376.

Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*. 2019; 11(1):164.

Thomas AM, Manghi P, Asnicar F, Pasolli E, Armanini F, Zolfo M, *et al*. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nat Med*. 2019 Apr;25(4):667–78.

Thomas AM, Segata N. Multiple levels of the unknown in microbiome research. *BMC Biol*. 2019 Jun 12;17(1):48.

Tindall BJ, Euzéby JP. Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatrionicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadricoccus* Maszenan et al. 2002, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006 Nov;56(Pt 11):2711–3.

Ting NL, Lau HC, Yu J. Cancer pharmacomicrobiomics: targeting microbiota to optimise cancer therapy outcomes. *Gut*. 2022;71:1412–1425.

Toh JWT, Phan K, Hitos K, Pathma-Nathan N, El-Khoury T, Richardson AJ, *et al*. Association of mechanical bowel preparation and oral antibiotics before elective colorectal surgery with surgical site infection: a network meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2018;1:e183226.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2017. p. 157, 418.

Tsalikidis C, Mitsala A, Mentonis VI, Romanidis K, Pappas-Gogos G, Tsaroucha AK, *et al*. Predictive factors for anastomotic leakage following colorectal cancer surgery: where are we and where are we going? *Curr Oncol*. 2023 Mar 7;30(3):3111–3137.

Tytgat HL, Nobrega FL, van der Oost J, de Vos WM. Bowel biofilms: Tipping points between a healthy and compromised gut? *Trends Microbiol*. 2019;27(1):17–25.

Uemura H, Hayakawa K, Shimada K, Tojo M, Nagamatsu M, Miyoshi-Akiyama T, *et al*. *Parvimonas micra* as a causative organism of spondylodiscitis: a report of two cases and a literature review. *Int J Infect Dis*. 2014 Jun;23:53–55.

Vallance A, Wexner S, Berho M, Cahill R, Coleman M, Haboubi N, *et al*. A collaborative review of the current concepts and challenges of anastomotic leaks in colorectal surgery. *Colorectal Dis*. 2017;19:O1–O12.

Van der Pas MH, Haglind E, Cuesta MA, Fürst A, Lacy AM, Hop WC, *et al*. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer (COLOR II): short-term outcomes of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:210–218.

Van der Vliet JA, Willems MCM, de Man BM, Lomme RMLM, Hendriks T. Everolimus interferes with healing of experimental intestinal anastomoses. *Transplantation*. 2006;82:1477–1483.

Van Helsdingen CP, Jongen AC, de Jonge WJ, Bouvy ND, Derikx JP. Consensus on the definition of colorectal anastomotic leakage: a modified Delphi study. *World J Gastroenterol*. 2020;26(23):3293–3303.

Van Praagh JB, de Goffau MC, Bakker IS, Harmsen HJM, Olinga P, Havenga K. Intestinal microbiota and anastomotic leakage of stapled colorectal anastomoses: a pilot study. *Surg Endosc*. 2016;30:2259–2265.

Van Praagh JB, de Goffau MC, Bakker IS, van Goor H, Harmsen HJM, Olinga P, *et al*. Mucus microbiome of anastomotic tissue during surgery has predictive value for colorectal anastomotic leakage. *Ann Surg*. 2019;269:911–916.

Van Rooijen SJ, Huisman D, Stuijvenberg M, Stens J, Rouflart M, Daams F, *et al*. Intraoperative modifiable risk factors of colorectal anastomotic leakage: why surgeons and anesthesiologists should act together. *Int J Surg*. 2016;36:183–200.

Van't Sant HP, Weidema WF, Hop WC, Lange JF, Contant CM. Evaluation of morbidity and mortality after anastomotic leakage following elective colorectal surgery in patients treated with or without mechanical bowel preparation. *Am J Surg*. 2011;202:321–324.

Van't Sant HP, Weidema WF, Hop WCJ, Lange JF, Contant CME. The influence of mechanical bowel preparation in elective lower colorectal surgery. *Ann Surg*. 2010;252:575–576.

Vasiliu ECZ, Zarnescu NO, Costea R, Neagu S. Review of risk factors for anastomotic leakage in colorectal surgery. *Chir*. 2015; 110:319–326.

Veirup N, Kyriakopoulos C. Neomycin [Internet]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560603/>. Acesso em: 10 jul 2025.

Veloo ACM, Chlebowicz M, Winter HLJ, Bathoorn D, Rossen JWA. Three metronidazole-resistant *Prevotella bivia* strains harbour a mobile element, encoding a novel *nim* gene, *nimK*, and an efflux small MDR transporter. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(10):2687–90.

Vemuri RC, Gundamaraju R, Shinde T, Eri R. Therapeutic interventions for gut dysbiosis and related disorders in the elderly: Antibiotics, probiotics or faecal microbiota transplantation? *Benef. Microbes* 2017; 8:179–192.

Vennix S, Pelzers L, Bouvy N, Beets GL, Pierie J-P, Wiggers T, *et al*. Laparoscopic versus open total mesorectal excision for rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;4:CD005200.

Verduin WM, Warps A-LK, van den Helder R, Doodeman HJ, Houdijk APJ; INfluences of Fat And MUscle in colorectal Surgery Collaborative. Visceral fat and anastomotic leakage after colon cancer resection. *Dis Colon Rectum*. 2021;64:163–170.

Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, *et al*. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*. 2019;68(10):1820-1826.

Wade H, Pan K, Duan Q, Kaluzny S, Pandey E, Fatumoju L, *et al.* *Akkermansia muciniphila* and its membrane protein ameliorates intestinal inflammatory stress and promotes epithelial wound healing via CREBH and miR-143/145. *J Biomed Sci.* 2023;30(1):38.

Waksman SA, Lechevalier HA, Harris DA. Neomycin—production and antibiotic properties. *J Clin Invest.* 1949;28:934–939.

Waksman SA, Lechevalier HA. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science.* 1949;109(2830):305–307.

Wang Z, Xu W, Liu D, Li X, Liu S, Wu X, *et al.* Impact of food physical properties on oral drug absorption: a comprehensive review. *Drug Des Devel Ther.* 2025 Jan 16;19:267–280.

Wangkheimayum J, Bhattacharjee M, Das BJ, Paul D, Dhar D, Chakravarty A, *et al.* Expansion of acquired 16S rRNA methyltransferases along with CTX-M-15, NDM and OXA-48 within three sequence types of *Escherichia coli* from northeast India. *BMC Infect Dis.* 2020 Jul 25;20(1):544.

Watanabe J, Tatsumi K, Ota M, Suwa Y, Suzuki S, Watanabe A, *et al.* The impact of visceral obesity on surgical outcomes of laparoscopic surgery for colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2014;29:343–351.

Weber MC, Berlet M, Stoess C, Reischl S, Wilhelm D, Friess H, *et al.* A nationwide population-based study on the clinical and economic burden of anastomotic leakage in colorectal surgery. *Langenbecks Arch Surg.* 2023 Jan 23;408(1):55.

Wentworth CC, Jones RM, Kwon YM, Nusrat A, Neish AS. Commensal-epithelial signaling mediated via formyl peptide receptors. *Am J Pathol.* 2010;177:2782–2790.

WHO. Colorectal cancer. 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>. Acesso em: 03 fev 2025.

Wong SH, Kwong TN, Chow TC, Luk AK, Dai RZ, Nakatsu G, *et al.* Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia. *Gut.* 2016.

Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Oct;2(5):499–503.

Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jul 29;57(10):1451–1470.

Wu H, Zhang J, Zhou B. Toothbrushing frequency and gastric and upper aerodigestive tract cancer risk: A meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2021 May;51(5):e13478.

Wu-Woods NJ, Barlow JT, Trigodet F, Shaw DG, Romano AE, Jabri B, *et al.* Microbial-enrichment method enables high-throughput metagenomic characterization from host-rich samples. *Nat Methods.* 2023 Nov;20(11):1672–1682.

Xu L, Song M, Jiang Y, Li X. Comparative effectiveness of oral antibiotics, probiotics, prebiotics, and synbiotics in the prevention of postoperative infections in patients undergoing colorectal surgery: a network meta-analysis. *Int Wound J.* 2023;20:567–578.

- Yang J, Luo Y, Tian T, Dong P, Fu Z. Effects of neoadjuvant radiotherapy on postoperative complications in rectal cancer: a meta-analysis. *J Oncol*. 2022;2022:8197701.
- Yang T, Wei M, He Y, Deng X, Wang Z. Impact of visceral obesity on outcomes of laparoscopic colorectal surgery: a meta-analysis. *ANZ J Surg*. 2015;85:507–513.
- Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, *et al*. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222–227.
- Yu T, Guo F, Yu Y, Sun T, Ma D, Han J, *et al*. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell*. 2017 Jul 27;170(3):548–63.e16.
- Yu Y, Wu Z, Shen Z, Cao Y. Preoperative C-reactive protein-to-albumin ratio predicts anastomotic leak in elderly patients after curative colorectal surgery. *Cancer Biomark*. 2020;27:295–302.
- Yu ZL, Liu XH, Liu HS, Ke J, Zou YF, Cao WT, *et al*. Impact of pelvic dimensions on anastomotic leak after anterior resection for patients with rectal cancer. *Surg Endosc*. 2021;35(5):2134–2143.
- Yurtsev EA, Chao HX, Datta MS, Artemova T, Gore J. Bacterial cheating drives the population dynamics of cooperative antibiotic resistance. *Nature*. 2009;460(7252):538–541.
- Zamorano D, Ivulic D, Viver T, Morales F, López-Kostner F, Vidal RM. Microbiota phenotype promotes anastomotic leakage in a model of rats with ischemic colon resection. *Microorganisms*. 2023;11:680.
- Zarnescu EC, Zarnescu NO, Costea R. Updates of risk factors for anastomotic leakage after colorectal surgery. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11:2382.
- Zhang W, Lou Z, Liu Q, Meng R, Gong H, Hao L, *et al*. Multicenter analysis of risk factors for anastomotic leakage after middle and low rectal cancer resection without diverting stoma: a retrospective study of 319 consecutive patients. *Int J Colorectal Dis*. 2017;32:1431–1437.
- Zhang X, Wu Q, Hu T, Gu C, Xubing Z, Wang Z. Laparoscopic versus conventional open surgery in intersphincteric resection for low rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018;28:189–200.
- Zhang Y, Zhou W, Wang Y, Li X, Zhu D, Zhang Q. Bioequivalence study of two metronidazole tablets in healthy Chinese volunteers under fasting and fed conditions. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2014 Jul;52(7):603–9.
- Zhao L, Zhang X, Zhou Y, Fu K, Lau HC, Chun TW, *et al*. *Parvimonas micra* promotes colorectal tumorigenesis and is associated with prognosis of colorectal cancer patients. *Oncogene*. 2022;41(26):4200–10.
- Zhong M, Xiong Y, Ye Z, Zhao J, Zhong L, Liu Y, *et al*. Microbial community profiling distinguishes left-sided and right-sided colon cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:498502.

Zhou Y, Mihindukulasuriya KA, Gao H, La Rosa PS, Wylie KM, Martin JC, *et al.* Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome Biol.* 2014 May 7;15(5):R66.

Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature.* 2019;570(7762):462–467.

Zmora O, Mahajna A, Bar-Zakai B, Hershko D, Shabtai M, Krausz MM, Ayalon A. Is mechanical bowel preparation mandatory for left-sided colonic anastomosis? Results of a prospective randomized trial. *Tech Coloproctol.* 2006;10:131–135.

ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

 A.C. Camargo Cancer Center	FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE - A.C. CAMARGO CANCER CENTER													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Avaliação do papel da microbiota e do perfil imune no desenvolvimento de fístulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal														
Pesquisador: Emmanuel Dias-Neto														
Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);														
Versão: 1														
CAAE: 49187721.8.0000.5432														
Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE														
Patrocinador Principal: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 4.908.028														
Apresentação do Projeto: As informações elencadas nos itens "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1785543.pdf", gerado pela Plataforma Brasil em 07/07/2021.														
Resumo: Câncer colorretal (CRC) é o terceiro tipo de câncer mais frequente e a segunda maior causa de morte por câncer no mundo. Estima-se que com a tendência ao envelhecimento da população a taxa de incidência global anual aumente aproximadamente 80% nas próximas duas décadas. Os pacientes tratados cirurgicamente para CRC, durante o pós-operatório – usualmente na primeira semana – podem desenvolver fístulas anastomóticas (FA). O surgimento das FAs leva a um pior prognóstico para pacientes de câncer colorretal ressecados, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade. As principais complicações da ocorrência de fístulas são desnutrição, desequilíbrio eletrolítico e sepse, responsável por 1/3 dos óbitos associados a pacientes com câncer colorretal ressecados. Este desfecho clínico impacta também o tempo de internação dos pacientes, devido a maior quantidade de procedimentos e terapias necessárias, elevando o custo hospitalar em até 10														
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211</td> <td>CEP: 01.509-900</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Liberdade</td> <td>Município: SAO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Telefone: (11)2189-5020</td> <td>E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Fax: (11)2189-5020</td> <td></td> </tr> </table>			Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211		CEP: 01.509-900	Bairro: Liberdade	Município: SAO PAULO		UF: SP	Telefone: (11)2189-5020	E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br		Fax: (11)2189-5020	
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211		CEP: 01.509-900												
Bairro: Liberdade	Município: SAO PAULO													
UF: SP	Telefone: (11)2189-5020	E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br												
	Fax: (11)2189-5020													



**FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER**



Continuação do Parecer: 4.908.028

vezes. Pacientes que desenvolvem fistulas também poder ter a continuidade do seu tratamento impactada, com atraso nas sessões de quimioterapia adjuvante. Os fatores de risco para o desenvolvimento de fistulas ainda não estão esclarecidos, sendo possível encontrar diversos dados conflitantes na literatura.

Atualmente, diversas doenças têm sido associadas a alterações na microbiota intestinal, elemento que pode ter um impacto como potencial ferramenta preditiva no desenvolvimento das fistulas. Sabendo-se que bactérias podem influenciar a inflamação e a resposta a recuperação cirúrgica, avaliaremos diferenças na microbiota entre pacientes com câncer colorretal que tenham ou não desenvolvido fistulas. Especificamente, a microbiota será avaliada por ferramentas de sequenciamento NGS (16S e shotgun) a partir de amostras de líquido peritoneal, amostras de fezes antes e após tratamento com antibióticos, além da microbiota presente na peça ressecada. Deste modo, buscaremos contribuir na compreensão e prevenção da ocorrência deste desfecho.

CAUSUÍSTICA

Atualmente, a estimativa de câncer colorretal no mundo é de cerca de 1,2 milhão de novos casos, dos quais aproximadamente 600.000 pacientes irão a óbito (KAMIERCZAK-SIEDLECKA et al. 2020). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) no Brasil, em 2020, foram estimados 40.990 casos, sendo 20.520 homens e 20.470 mulheres, seguidos de 19.603 mortes, sendo 9.608 homens e 9.995 mulheres (INCA 2021).

Os pacientes tratados cirurgicamente para CRC, durante o pós-operatório – usualmente na primeira semana – podem desenvolver FAs (BERKOVICH et al. 2016; WERCKA et al. 2016), no entanto a ocorrência deste quadro clínico é muito variável, entre 0,5% e 34%, possivelmente devido divergências encontradas nas definições do que são fistulas (RAMPHAL et al. 2018). Contudo, fistulas são caracterizadas pelo vazamento do

conteúdo fecal no interior da cavidade intestinal, cujas principais complicações seriam desnutrição, desequilíbrio eletrolítico e o desenvolvimento de um quadro clínico de sepse, responsável por 1/3 dos óbitos associados a pacientes com câncer colorretal ressecados (ALBERTS et al. 2003; RAHBARI et al. 2010; WERCKA et al. 2016).

No Centro de Referência Colorretal do AC Camargo Cancer Center, realizamos em torno de 300 cirurgias com anastomoses colorretais por ano. Nossa taxa atual de fistulas é de 12%, sendo mais alta nos casos de tumores do reto previamente submetidos a quimiorradioterapia (fonte: dados departamentais).

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

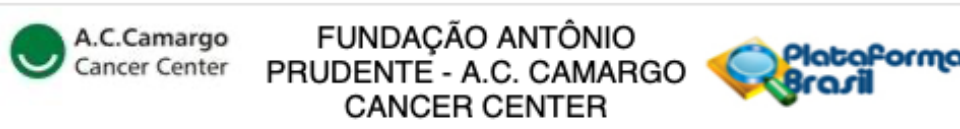
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.908.028

Hipótese:

Nossa hipótese é que o perfil imune e a microbiota do indivíduo podem funcionar protegendo ou favorecendo o aparecimento de fistulas pós cirúrgicas em pacientes com câncer colorretal.

Metodologia Proposta:

• CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo é afiliado do ao projeto CARmEm, previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center. Os participantes de pesquisa para este estudo serão recrutados voluntariamente conforme assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido exclusivo para o projeto (TCLE).

• POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo será composto de uma população constituída por pacientes diagnosticados com câncer colorretal no A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo - SP, e que serão tratados cirurgicamente nesta mesma instituição no período de 2021-2023. As análises relacionadas ao perfil imunológico dos pacientes serão realizadas no laboratório de Imuno-Oncologia Translacional do A. C. Camargo Cancer Center, sob supervisão do Dr. Kenneth Gollob, enquanto as análises relacionadas à microbiota serão realizadas no laboratório de Genômica Médica do A. C. Camargo Cancer Center, sob supervisão do Dr. Emmanuel Dias-Neto.

Casos e controles: Avaliaremos uma coorte de 400 pacientes consecutivos, pareados por sexo, idade (intervalos de até 5 anos), localização e estágio do tumor, divididos entre grupo com FAs e sem FAs. Pacientes serão atribuídos aos grupos pela ocorrência ou não-ocorrência do desfecho (FAs), dentro do período de 30 dias após a cirurgia. Buscaremos atingir pelo menos 20 pacientes no grupo com FAs, os quais serão pareados 1:1 ou 1:2 com indivíduos sem FAs, conforme comportamento e distribuição de casos em cada grupo.

• COLETA DE DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Serão coletados dados referentes à dieta, histórico familiar e pessoal de câncer, estilo de vida, uso de medicamentos, dados ocupacionais e demais dados pertinentes ao estudo. Estes dados serão coletados através de questionários específicos com informações obtidas por entrevista com o paciente/famíliares. Dados clínicos, epidemiológicos, de tratamento, dados de follow-up e demais dados pertinentes à doença e tratamento serão obtidos dos prontuários. Todas as informações serão organizadas em um banco estruturado na ferramenta RedCap.

• COLETA DE AMOSTRAS

Feces: serão coletadas em dois momentos: 1) em casa, pelo paciente, antes da cirurgia, em frasco

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



**FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER**



Continuação do Parecer: 4.908.028

próprio fornecido pelo estudo antes do início de uso de antibiótico. 2) resíduos de fezes presentes na peça cirúrgica, quando a mesma é

encaminhada para o Depto de Anatomia Patológica. Também acondicionado em frasco próprio, fornecido pelo estudo. Para ambos os pontos basta uma massa pequena, equivalente a cerca de 0,5 grama ou 0,5mL. Líquido peritoneal: é coletado durante a cirurgia, logo após a abertura da cavidade abdominal e acesso ao sítio cirúrgico. O material é coletado por meio de aspiração do líquido peritoneal no fundo de saco pélvico ou no recesso das goteiras parieto-cólicas. Na ausência de líquido peritoneal, a cavidade deve ser lavada com pequeno volume de soro fisiológico estéril. Serão coletados no máximo 5mLs deste líquido, em um único tubo estéril fornecido pelo projeto. Todas as amostras serão congeladas imediatamente e preservadas a -80 °C.

Bordas proximal e distal de segmento de cólon ou reto ressecado – Estas amostras são obtidas a partir do material enviado ao Depto de Anatomia Patológica. Serão coletados fragmentos distais e proximais (cerca de 0,5 cm de comprimento), sem comprometer as porções necessárias para o diagnóstico, com ênfase em tecido que represente as áreas onde serão feitas as suturas cirúrgicas). Este material será usado para avaliar a microbiota tecidual.

Sangue – O sangue periférico dos pacientes será coletado em três tubos de EDTA 5 mL antes do início de uso de antibiótico e antes da cirurgia. Serão separados plasma e purificados PBMC (Human peripheral blood mononuclear cell) para avaliação do perfil

imune solúvel e celular, respectivamente. O processamento do sangue será feito dentro de 2 a 4 horas após a coleta.

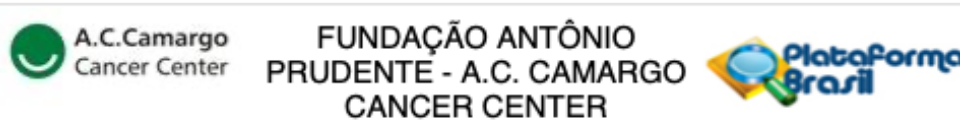
Critério de Inclusão:

- Pacientes portadores de carcinoma colorretal;
- Pacientes com idade superior a 40 anos;
- O procedimento cirúrgico deve ser realizado no A. C. Camargo Cancer Center;

Critério de Exclusão:

- Pacientes que recusarem tratamento cirúrgico;
- Pacientes que não aceitarem participar deste estudo.
- Cirurgias de urgência por obstrução ou perfuração tumoral.
- Pacientes em uso crônico de corticosteroides.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.908.028

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar o perfil imunológico solúvel e celular sistêmico e a microbiota de diferentes componentes teciduais em pacientes com câncer colorretal submetidos ao tratamento, divididos em grupos com e sem fístulas cirúrgicas, buscando compreender o papel das populações de células imunes e de microorganismos neste evento, gerando dados que podem ser úteis para a maior sobrevida e melhor qualidade de vida dos pacientes, reduzindo tempo de internação e custos médicos associados.

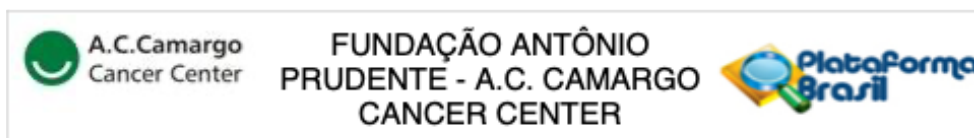
Objetivo Secundário:

- Avaliar possíveis correlações entre fatores ambientais, epidemiológicos e clínicos na ocorrência de fístulas em pacientes com câncer colorretal;
- Determinar a composição da microbiota bacteriana no líquido peritoneal, bordas cirúrgicas em pacientes pareados, com e sem fístulas, pela abordagem 16S;
- Determinar a composição da microbiota bacteriana, arquea, fúngica e viral em amostras de fezes, pré e pós-antibiótico terapia, para pacientes pareados, com e sem fístulas pela abordagem de shotgun sequencing;
- Buscar correlacionar a presença de determinados microrganismos, em conjunto ou isoladamente, ao desenvolvimento de fístulas pós-cirúrgicas em pacientes com tratamento cirúrgico do câncer colorretal;
- Buscar correlacionar a presença de determinados fatores clínico-epidemiológicos e o desenvolvimento de fístulas pós-cirúrgicas em pacientes com tratamento cirúrgico do câncer colorretal;
- Avaliar o impacto da antibioticoterapia na composição da microbiota fecal e a resposta imunológica em pacientes com e sem o surgimento de fístulas anastomóticas;
- Determinar o perfil imune celular sistêmico no sangue periférico pelo estudo de populações de células T (CD4 +, CD8 +, DN, NKT), NK, B, mieloides (subpopulações de monócitos), e seus estados de ativação, e potencial funcional utilizando citometria de fluxo;
- Determinar o perfil imune sistêmico solúvel medindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no plasma utilizando multiplex bead arrays.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores:

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211			
Bairro: Liberdade			CEP: 01.509-900
UF: SP	Município: SAO PAULO		
Telefone: (11)2189-5020	Fax: (11)2189-5020	E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br	



Continuação do Parecer: 4.908.028

Riscos:

Os riscos relacionados à coleta de amostras dos participantes de pesquisa, são aqueles inerentes à cirurgia que o mesmo será submetido independente desta pesquisa e que faz parte do tratamento determinado pelo seu médico. A coleta de sangue para análise do perfil imune pode acarretar dor no local e manchas rochas temporárias. Além disso, para este estudo, os pesquisadores precisarão ter acesso aos dados clínicos dos prontuários, havendo risco mínimo de perda de confidencialidade.

Benefícios:

Os participantes de pesquisa não se beneficiarão diretamente dos resultados obtidos neste estudo, no entanto, irão colaborar para melhor compreensão da ocorrência de fistulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal após tratamento cirúrgico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo prevê a inclusão de 400 participantes de pesquisa.

Foi apresentado TCLE.

Os casos serão aqueles que desenvolverem fistula e os controles serão aqueles que não desenvolverem fistula.

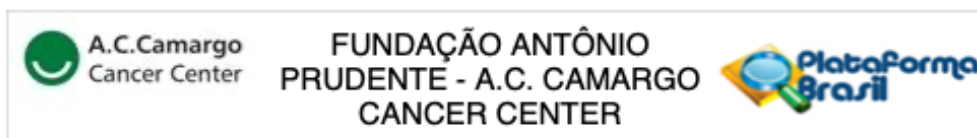
Haverá coleta de amostras biológicas humanas: fezes (2 momento: em casa antes da cirurgia e no ato operatório resíduos de fezes presentes na peça cirúrgica), líquido peritoneal (5 ml no momento da cirurgia), tecido (serão fornecidas pela anatomia patológica após definido o diagnóstico, bordas proximal e distal de segmento de cólon ou reto, sem comprometer o diagnóstico), sangue (3 tubos de 5 ml cada- uma única vez).

Serão coletados dados referentes à dieta, histórico familiar e pessoal de câncer, estilo de vida, uso de medicamentos, dados ocupacionais e demais dados pertinentes ao estudo.

Dados clínicos, epidemiológicos, de tratamento, dados de follow-up e demais dados pertinentes à doença e tratamento serão obtidos dos prontuários.

Todas as informações serão organizadas em um banco estruturado na ferramenta RedCap.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.908.028

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Recomendações:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após apreciação dos documentos anexados à Plataforma Brasil, não foram observados óbices éticos na presente submissão.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto em referência (registro CEP nº. 2835/20D) será desenvolvido por Lais Fernanda Alcarde, aluna de Doutorado.

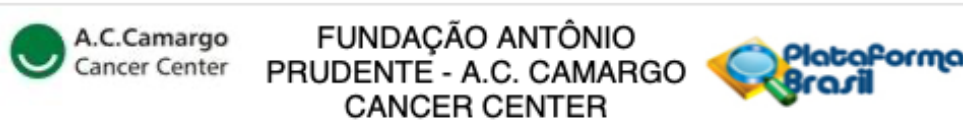
NOTA: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1785543.pdf	07/07/2021 12:51:58		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoassinada.pdf	07/07/2021 12:51:13	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_fistula_CEP.docx	02/07/2021 16:04:21	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	Carta_de_submissao_subprojeto.docx	02/07/2021 16:03:46	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Fistula_CEP.docx	02/07/2021 16:02:35	Emmanuel Dias-Neto	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
 Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.908.028

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 16 de Agosto de 2021

Assinado por:
Luciana Facure Moredo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br

APÊNDICES

Apêndice A – Métodos e resultados referentes as coletas de líquido peritoneal e tecidos

Coleta de amostras

As amostras de líquido peritoneal foram coletadas durante a cirurgia, logo após a abertura da cavidade abdominal para acesso ao sítio cirúrgico. O material foi aspirado do fundo de saco pélvico ou do recesso das goteiras parieto-cólicas. Na ausência de líquido peritoneal, a cavidade foi lavada com pequeno volume de soro fisiológico estéril e aspirado com o auxílio de uma seringa de 10mL. Após a coleta, a seringa devidamente vedada foi imediatamente direcionada ao Departamento de Anatomia Patológica, onde o líquido peritoneal foi transferido para dois criotubos, totalizando 4mL, e congelados a -80°C imediatamente após a transferência.

Na coleta das amostras das bordas proximal e distal do segmento de cólon ou reto ressecado, a peça cirúrgica foi enviada ao Depto de Anatomia Patológica antes do acondicionamento em formal, permitindo a coleta das amostras, sem comprometer as porções necessárias para diagnóstico. A coleta foi realizada de forma a priorizar o tecido representativo das áreas de sutura cirúrgica. As amostras foram coletadas por residentes do Departamento de Anatomia Patológica ou por técnicos treinados, que realizaram a separação do tecido muscular e mucoso das margens da peça excisada, com cerca de 0,5cm de comprimento. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em criotubos e imediatamente congeladas a -80°C.

Extração de ácidos nucleicos (DNA)

A extração de DNA das amostras biológicas foi realizada utilizando o *kit EZNA® Universal Pathogen Kit* (Omega Bio-tek, EUA), utilizando os protocolos de extração de DNA para fezes e tecidos, com modificações padronizadas estabelecidas previamente pelo grupo, com o objetivo de otimizar a lise celular e obter maior homogeneização das amostras.

Nas amostras de líquido peritoneal, antes do início do protocolo de extração, o material foi transferido para tubos cônicos e submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos

para sedimentação das células. O sobrenadante foi cuidadosamente separado e o pellet ressuspendido em 250µL do sobrenadante, iniciando-se então o protocolo de extração de DNA para fezes, com as adaptações mencionadas na sessão 3.9.

Para as amostras de tecido, foram adotadas modificações semelhantes às descritas para fezes, com aumento do tempo de vórtex (lise física) para 10 minutos, quantidade de proteinase K de 40µL, elevação do tempo de incubação de 15 para 3 horas.

Após a extração, o DNA de todas as amostras foi quantificado utilizando o *Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram então armazenadas a -20°C até a etapa de amplificação e sequenciamento.

Sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA Bacteriano

Para a avaliação da composição bacteriana nas amostras de tecido e líquido peritoneal, foi empregada a abordagem de sequenciamento das regiões V3–V4 do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) bacteriano. A amplificação do gene-alvo foi realizada com os iniciadores U341F (5'-CCTACGGGSGCAGCAG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), gerando amplicons com comprimento médio de 510 pares de bases.

As reações de amplificação por PCR foram realizadas utilizando a enzima *KAPA2G Robust HotStart Mix* (KAPA Biosystems, EUA) e as condições de termociclagem e reação foram avaliadas para obtenção de melhor performance. O controle de qualidade foi realizado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *SYBR Safe* (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando 4µL do produto de PCR. Como controle positivo foi utilizado DNA de *Escherichia coli*, e como controle negativo água ultrapura (Sigma, EUA).

Na etapa de otimização da PCR, foram avaliadas diferentes condições de termociclagem, incluindo número de ciclos (32 e 35), temperaturas de anelamento (53°C e 55°C) e intervalos (15 e 45 segundos). Também foram testados diferentes volumes finais de reação (15µL e 35µL) e variações de massas (0,5 a 8ng), conforme descrito na **Tabela A1**.

Tabela A1: Condições de termociclagem testadas para otimização da amplificação do gene 16S (regiões V3-V4).

	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6	Método 7	Método 8	Método 9	Método 10
<i>Termociclagem e Anelamento</i>										
Temperatura	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C	53°C	55°C	55°C	55°C	55°C
Tempo	15 seg.	15 seg.	45 seg.	45 seg.	45 seg.	45 seg.	45 seg.	45 seg.	45 seg.	45 seg.
Ciclo	32	32	32	32	35	32	32	32	32	32
<i>Reação</i>										
Massa	5ng	8ng	8ng	8ng	8ng	8ng	3ng	2ng	0,5ng	8ng
Volume final da reação	15µL	15µL	15µL	35µL	35µL	35µL	35µL	35µL	35µL	35µL

Após a definição das condições ideais de amplificação (método 10), conforme **Tabela A2 e A3**, os amplicons foram purificados com esferas magnéticas *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter, EUA) e quantificados utilizando o *Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA), em seguida, foi realizada a construção das bibliotecas e o sequenciamento das amostras.

Tabela A2: Condições de amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA

Reação	Volume (µl)
Primer U341F (5µM)	3,5
Primer U806R (5µM)	3,5
Kapa 2G Robust Mix Hotstart	17,5
Amostra + H2O	10,5
Volume final	35

Tabela A3: Condições de termociclagem para amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1x
Desnaturação	95°C	20 segundos	32x
Anelamento	55°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1x

A construção das bibliotecas foi realizada conforme protocolo recomendado pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando o *Ion Plus Fragment Library Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para cada amostra, foram utilizados 55ng de amplicon purificado, com exceção de uma única amostra com massa de 30ng (valores dentro da margem de aceitação da plataforma). A quantificação das bibliotecas foi realizada por PCR quantitativo em tempo real, utilizando o *kit Ion Library TaqMan Quantitation* (Thermo Fisher Scientific, EUA). O sequenciamento foi realizado pela plataforma *Ion Torrent S5* (Thermo Fisher Scientific, EUA), com o uso dos reagentes *Ion 520 & Ion 530 ExT Kit-Chef* e *Ion 520 chip kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA), visando gerar ao menos 10.000 a 30.000 sequências por amostra.

Resultados e Discussão

Ao longo do estudo, algumas amostras foram perdidas ou deixaram de ser coletadas. Deste modo, para dois pacientes do grupo caso nenhuma amostra foi coletada (**Tabela A4**).

Tabela A4: Amostras coletadas ao longo do estado.

	Caso (n=21)	GE1-Co (n=47)	GE2-Co (n=17)	GE3-Co (n=125)
Líquido peritoneal	19	45	62	160
Margens cirúrgicas	19	47	64	159

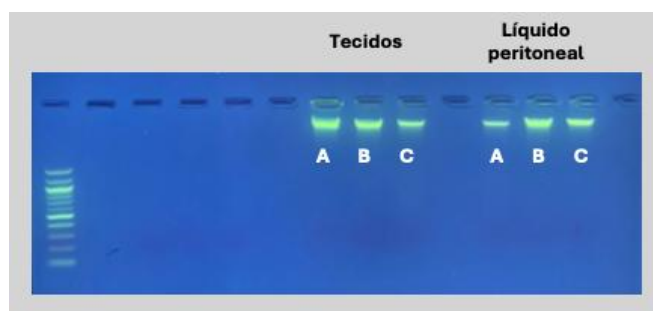
Caracterização da microbiota por sequenciamento do gene 16S

Para compreender melhor a população microbiana potencialmente envolvida no desfecho de fístulas anastomóticas, foram coletadas amostras de tecido das margens distais e proximais da peça cirúrgica e líquido peritoneal obtido no momento do acesso ao sítio cirúrgico para análise do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) bacteriano.

Antes de iniciar os testes de otimização da reação de PCR, as amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese para avaliação da integridade do material. Conforme ilustrado na **Figura A1**, o DNA apresentou integridade molecular, com fragmentos de alto peso molecular. No gel de agarose 1%, cada amostra exibiu uma banda única, bem

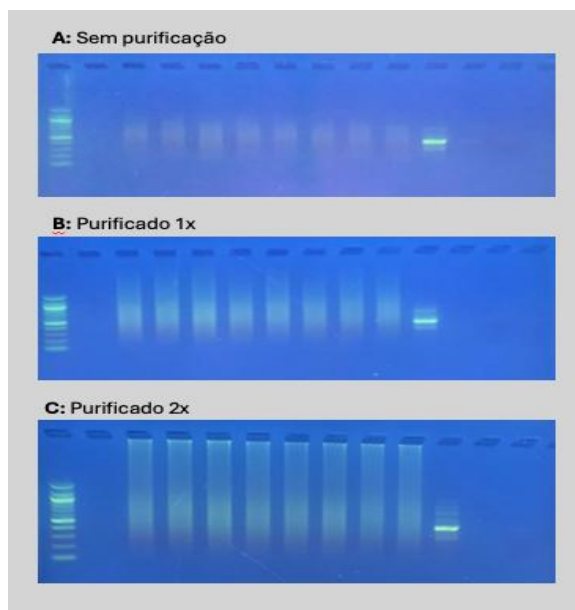
definida, sem arraste e com alto peso molecular. Esses resultados indicam que o DNA extraído permaneceu íntegro e adequado para as análises subsequentes.

Figura A1: Análise de integridade do DNA extraído de tecidos e líquido peritoneal. **Tecidos:** A – tecido muscular; B – tecido muscular; C – mucosa; **Líquido peritoneal:** A – amostra não quantificável; B: amostra contaminada com sangue; C – amostra quantificável e sem sangue.



Foram necessários testes de otimização da PCR, onde diversas condições de reação foram testadas, com o objetivo de melhorar a eficiência da amplificação e reduzir o efeito de arraste. No entanto, a amplificação manteve um nível elevado de arraste e sem a formação de bandas definidas (**Figura A2 – A**). Também foi avaliada a possibilidade de purificação dos amplicons com esferas magnéticas na proporção de 0,55:1, nas amostras de líquido peritoneal e tecido muscular e mucosa, onde é esperado a seleção de fragmentos $\geq 300\text{pb}$ (Van Praagh *et al.* 2016). O produto da purificação foi utilizado como carga inicial para a próxima purificação. No entanto, esse procedimento resultou em um aumento ainda maior do arraste (**Figura A2 – B e C**).

Figura 2: Efeito do produto de PCR utilizando amplicons purificados como carga inicial.



Como a amplificação das regiões V3 e V4 com os iniciadores (U341F e 806R) deve gerar amplicons ao redor de 510pb, sendo estes, variáveis em sequência nucleotídica e em tamanho, uma certa variabilidade e ausência de bandas bem definidas é algo esperado quando se analisa uma população complexa de bactérias. Deste modo, optamos por seguir com o sequenciamento das amostras, sem a etapa adicional de purificação.

O ensaio de 16S foi conduzido com 60 amostras de tecido, divididas igualmente entre tecido muscular e mucosa, proveniente das margens proximais e distais e 15 amostras de líquido peritoneal. A cobertura do ensaio foi superior a 5 milhões de reads em um total de 75 amostras. Após a obtenção dos dados brutos, as reads passaram por etapas de filtragem computacional. Observou-se que a mediana de reads eliminadas durante o controle de qualidade foi superior a 98,0%, com cerca de 10,0% sendo removidas devido ao tamanho inferior a 100pb e mais de 87,0% descartadas por alinhamento com DNA humano. Nas amostras de líquido peritoneal, a retenção de reads após o controle de qualidade foi ligeiramente menor em comparação às amostras de tecido, com uma média de menos de 15% dos reads brutos remanescendo após a filtragem (**Tabela A5**).

Esses resultados indicam que a etapa de PCR não foi eficiente, comprometendo a viabilidade da técnica de 16S na continuidade do estudo.

Tabela A5: Reads obtidas pela técnica de sequenciamento 16S.

		Reads brutos	≤ 100pb		Humanos		Reads finais
Amostras			Reads	%	Reads	%	
<i>Margem proximal</i>							
Muscular							
	média	49788	5379	10,7%	4634	87,7%	17
	mediana	30023	3238	10,6%	2917	89,0%	0
	máximo	118669	12734	11,9%	15920	90,4%	242
	mínimo	4739	450	9,5%	381	74,3%	0
Mucosa							
	média	54321	5724	10,6%	4556	89,2%	0
	mediana	38118	4189	10,4%	2940	89,2%	0
	máximo	147433	15868	11,9%	13047	89,9%	4
	mínimo	5050	507	10,0%	404	88,0%	0
<i>Margem distal</i>							
Muscular							
	média	42181	4488	10,6%	4351	87,3%	12
	mediana	29659	3420	10,2%	2984	88,7%	0
	máximo	111965	11353	12,0%	17542	90,2%	160
	mínimo	9525	941	9,6%	885	74,2%	0
Mucosa							
	média	31521	3450	11,3%	2615	88,4%	1
	mediana	25089	2912	10,7%	1920	89,0%	0
	máximo	100128	11126	15,6%	7258	90,1%	11
	mínimo	4098	641	9,8%	309	84,0%	0
Líquido peritoneal							
	média	58684	6802	11,4%	7702	73,9%	211
	mediana	56421	6635	11,3%	5631	87,5%	22
	máximo	114889	14408	17,3%	32250	90,0%	1333
	mínimo	10056	1021	9,4%	1161	4,1%	0

A amplificação inespecífica do DNA humano na PCR pode estar relacionada à elevada concentração de DNA do hospedeiro nas amostras de tecido intestinal e líquido peritoneal, e uma quantidade ínfima de DNA bacteriano, resultando em uma amplificação inespecífica das sequências humanas, mesmo com primers direcionados para regiões conservadas nos genomas bacterianos. Esse achado é consistente com a maior proporção de DNA humano detectada nos tecidos em comparação ao líquido peritoneal.

Diversas técnicas de depleção do DNA humano têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir a proporção relativa de sequências do hospedeiro nos dados genômicos, melhorando assim a detecção de microrganismos menos abundantes (Gu, Miller e Chiu 2019;

Bruggeling *et al.* 2021; Wu, Zhang e Zhou 2021; Marotz *et al.* 2018; Pereira-Marques *et al.* 2019; Cheng *et al.* 2023). A proporção de DNA do hospedeiro pode alcançar até 99% das leituras, com variações que vão de 16,1% a 99,48% para sequências humanas, enquanto as leituras de DNA bacteriano variam entre 0,24% e 40,51% (Gu, Miller e Chiu 2019; Bruggeling *et al.* 2021). Essa predominância de sequências do hospedeiro limita a identificação de microrganismos menos abundantes a sensibilidade analítica das abordagens metagenômicas (Gu, Miller e Chiu 2019; Bruggeling *et al.* 2021; Wu, Zhang e Zhou 2021).

Wu-Woods *et al.* (2023) descreve a utilização de esferas de vidro (0,1mm) combinadas com homogeneizador de alta velocidade na etapa de extração. Quando essa abordagem não se demonstra eficaz para realizar a lise das amostras, foi utilizada uma mistura de esferas de cerâmica, sílica e vidro (1,4mm, 0.1mm e 4mm), em conjunto com o mesmo método de homogeneização. Van Praagh *et al.* (2016) também relata o uso de homogeneizador de alta velocidade, porém com esferas de vidro maiores (3mm). Essa estratégia parece permitir otimizar a extração de DNA bacteriano em amostras onde o DNA do hospedeiro pode atuar como competidor. Esses trabalhos sugerem que o tamanho das esferas e a adoção de métodos mais vigorosos de homogeneização podem influenciar significativamente a eficiência da extração, reduzindo o viés na recuperação de DNA bacteriano.

Embora a alta proporção de DNA do hospedeiro em amostras de tecidos e fluídos ainda representem um obstáculo significativo para análises metagenômica, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de depleção e extração de DNA têm mostrado resultados promissores e apresentando-se como uma alternativa promissora para futuras análises. Como a baixa quantidade de sequências bacterianas impede uma análise criteriosa da microbiota, optamos por não utilizar estes dados, focando o trabalho na geração e análise de dados de sequenciamento shotgun.

Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e esclarecido



Projeto: “Avaliação da microbiota e o desenvolvimento de fístulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal”

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Número do Protocolo:
Título do Estudo: “Avaliação do papel da microbiota e do perfil imune no desenvolvimento de fístulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal”
Nome completo do Pesquisador: Dr. Emmanuel Dias-Neto
Nome da Instituição: A.C. Camargo Cancer Center
Telefone do pesquisador: (11) 2189-5023

I. Nome do Participante: _____

RGH: _____ Nº de Identificação no estudo: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: _____

II. Responsável Legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: _____

DADOS SOBRE O ESTUDO

Este é um projeto de pesquisa do Centro Internacional de Pesquisas do AC Camargo Cancer Center, que está sob responsabilidade do Dr. Emmanuel Dias-Neto. Todos os estudos de pesquisa devem ser aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa antes que qualquer indivíduo possa participar. O comitê de ética ajuda a proteger os interesses dos sujeitos em estudos de pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ensino e Pesquisa A. C. Camargo Cancer Center.

Duração da pesquisa: 52 meses.

Rúbrica do participante
de pesquisa ou
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:



EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Convidamos você a participar deste estudo, que tem por objetivo estudar o perfil imunológico no sangue (células e outros componentes de defesa do corpo) e os microorganismos presentes no intestino e nas fezes de pacientes com câncer colorretal, que serão submetidos a cirurgia. Alguns pacientes podem desenvolver fístulas pós-cirúrgicas, que são uma espécie de abertura que se dá depois da cirurgia na região do corte feito para a retirada do tumor. Estas fístulas podem levar a extravasamento de fezes, desenvolvimento de infecções, entre outras complicações.

Objetivos da pesquisa

Avaliar o perfil imunológico e os microorganismos presentes nas fezes, na cavidade abdominal e no intestino, buscando avaliar se eles podem estar associados ao aparecimento de fístulas cirúrgicas e com isso evitar o aparecimento destas complicações, diminuir o tempo de internação dos pacientes e diminuir os custos médicos.

Desenho da pesquisa

Os participantes de pesquisa devem ter sido diagnosticados com câncer de intestino (cólon ou reto) tendo sido indicada a cirurgia para a remoção do tumor. Após a cirurgia, uma pequena quantidade de indivíduos vai desenvolver uma fístula, evento de abertura ou não cicatrização do corte feito na cirurgia. Iremos comparar pessoas dos dois grupos (com e sem fístulas), com objetivo de identificar microorganismos que possam indicar quem vai ter esta complicação. As amostras a serem usadas são: i) uma pequena quantidade de fezes coletada antes da cirurgia e também durante a cirurgia, ii) uma pequena amostra do intestino do paciente, que normalmente seria descartado após a cirurgia e iii) uma pequena quantidade de líquido normalmente presente na cavidade abdominal, para estudarmos a presença de bactérias. Nenhuma dessas coletas para a pesquisa representam qualquer risco a você, exceto os riscos inerentes à cirurgia, não acarretando qualquer custo para você ou sua operadora de saúde e ou requerendo procedimentos invasivos além dos que você já será submetido dentro do seu tratamento por escolha do seu médico.

Procedimentos que serão realizados e propósitos

Caso você aceite participar do estudo, é necessário que você tenha sido diagnosticado com câncer de alguma porção do intestino. Neste caso, solicitamos sua cooperação e autorização para:

1. Coletar uma amostra de sangue (equivalente à uma colher de sopa) antes do início do uso de antibióticos e antes da sua cirurgia.
2. Coletar pequena amostra de fezes antes da cirurgia, em casa, usando material oferecido pelo estudo.

Rúbrica do participante
de pesquisa ou
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:



3. Analisar bactérias presentes no fragmento (pedaço) de intestino retirado na cirurgia. Este fragmento faz parte da porção retirada para remover o tumor. Iremos avaliar bactérias presentes nas fezes que se encontram dentro deste pedaço de intestino (na luz intestinal), assim como dentro do próprio tecido intestinal.
4. Estudar se existem bactérias presentes no chamado líquido peritoneal, um líquido que se encontra banhando os órgãos do abdômen e que pode conter bactérias relacionadas a um processo inflamatório e posterior desenvolvimento das fístulas.
5. Será aplicado questionário com perguntas pertinentes a hábitos alimentares, estilo de vida, histórico familiar e medicamentoso. O preenchimento do questionário leva em média 15 minutos para ser preenchido.

O que faremos com este material coletado? Vamos analisar as células e outros componentes de defesa do corpo presentes no sangue e extrair o DNA (material genético) das fezes e no pedaço de intestino para estudar quais microrganismos estão presentes nestas amostras e buscar sua correlação com proteção ou maior tendência ao desenvolvimento de fístulas.

Em nenhum caso a coleta destas amostras irá prejudicar o seu diagnóstico nem o seu tratamento.

Caso aceite participar do estudo você deverá:

- Ter mais que 18 anos de idade;
- Ter indicação médica de cirurgia e quimioterapia e/ou radioterapia;
- Coletar uma amostra de fezes antes da sua cirurgia no A.C. Camargo Cancer Center;
- Permitir a coleta das amostras prevista no estudo, e descritas acima, durante a sua cirurgia.

Quando você receber este formulário, explicaremos a você quais as razões da pesquisa e seu objetivo. Você terá o tempo que achar necessário para conversar com seus familiares ou outras pessoas sobre sua participação na pesquisa. Caso concorde em participar, você será questionado sobre alguns hábitos comuns, tais como: sua dieta, histórico familiar e pessoal de câncer, estilo de vida, uso de medicamentos e dados ocupacionais. Dados clínicos, epidemiológicos, e de seu tratamento serão obtidos de seu prontuário.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em duas vias, e caso você aceite participar desta pesquisa, ambas deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, por você (participante da pesquisa), ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s). O participante da pesquisa ficará com uma das vias, sendo que a outra ficará arquivada com o pesquisador.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o seu tratamento. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde durante o tratamento. Além disso, você e seu acompanhante tem direito a ressarcimento caso venham a ter qualquer despesa relacionada a esta pesquisa.

Rúbrica do participante
de pesquisa ou
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:



Ressaltamos que você tem direito e receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo patrocinador do estudo), pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa, mesmo diante de interrupção do estudo.

A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte da amostra coletada, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou a seu tratamento. Essa solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você, com validade a partir da data da comunicação da decisão.

Caso nem todo o seu material biológico coletado seja utilizado por esta pesquisa, este pode ser útil para pesquisas futuras. Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário. A utilização deste material está condicionada à aprovação de cada novo projeto pelo Comitê de ética desta Instituição (CEP), e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Dependendo da sua escolha, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento do remanescente de suas amostras após utilização por esta pesquisa:

() Autorizo o armazenamento das minhas amostras biológicas remanescentes ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros projetos após a aprovação do CEP.

() Não autorizo o armazenamento das minhas amostras biológicas remanescentes ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros projetos de pesquisa. Desta forma, compreendo que este material será descartado pelo Laboratório de Genômica Médica de acordo com as normas estabelecidas.

Caso você permita o uso das suas amostras em pesquisas futuras, favor assinalar uma das seguintes opções:

() Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center com meu material.

() Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

() Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Rúbrica do participante
de pesquisa ou
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:



Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros

Complicações e riscos esperados

Não existem riscos envolvidos com a coleta de nenhum dos materiais previstos no estudo, além dos riscos comuns associados à cirurgia que você será submetido independente desta pesquisa e que faz parte do seu tratamento. A coleta de sangue pode causar dor e manchas roxas temporárias, mas todos os procedimentos serão realizados por profissionais capacitados para evitar desconfortos. Além disso, para este estudo, os pesquisadores precisarão ter acesso aos dados clínicos de seu prontuário. Todos os dados levantados serão usados apenas para esta pesquisa científica, visando a melhor compreensão da ocorrência de fistulas cirúrgicas em câncer de intestino. Todos os esforços serão feitos no sentido de manter a privacidade das informações, que ficarão restritas aos médicos, pesquisadores e enfermeiros diretamente envolvidos neste projeto. Neste sentido, todo e qualquer dado que possa levar à sua identificação será codificado, fazendo com que o risco de perda de confidencialidade seja mínimo.

Benefícios que poderão ser obtidos

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para a identificação de marcadores biológicos (microrganismos) que podem ajudar a descobrir a causa de fistulas em cirurgias do intestino, com potencial de ajudar outros pacientes no futuro.

Rúbrica do participante
de pesquisa ou
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:

**Quem devo contatar em caso de dúvida?**

Em caso de dúvida, entre em contato com o Dr. Emmanuel Dias-Neto, no Laboratório de Genômica Médica do AC Camargo Cancer Center, pelo telefone (11) 2189-5023 ou pelo e-mail emmanuel@accamargo.org.br.

Caso o pesquisador responsável não forneça informações/esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center - SP pelo telefone (11) 2189-5020 ou pelo e-mail cep@accamargo.org.br. Este Comitê de Ética se localiza à Rua Prof. Antônio Prudente, 211, Liberdade, e seu horário de atendimento é de segunda-feira à sexta-feira das 8 às 17 horas. O Comitê de Ética em Pesquisa é um grupo formado por cientistas e não-cientistas que realizam a revisão ética inicial e contínua do estudo clínico para manter sua segurança e proteger seus direitos.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido adequadamente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definidos acima, eu concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado: **"Avaliação da microbiota e o desenvolvimento de fistulas anastomóticas em pacientes com câncer colorretal"**.

São Paulo, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

Apêndice C – Instrumento de coleta de dados



RGH: _____

ID Paciente: _____

FICHA CLÍNICA

1. FUMANTE? () Sim () Não () Ex-tabagista

Parou de fumar há quanto tempo? _____

Tipo de fumo: _____

Quantidade/dia: _____ Fuma ou fumou por quanto tempo: _____

2. CONSUME BEBIDA ALCOÓLICA 2 OU MAIS VEZES POR SEMANA? () Sim () Não

Tipo de bebida alcoólica: _____

Quantidade dose/dia: _____

Consome há quanto tempo: _____

Consumiu bebida alcoólica no passado (2x ou mais por semana) () Sim () Não

Se sim, por quantos anos? _____ Parou de beber a quantos anos? _____

3. DOENÇA SISTÊMICA

Hipertensão Arterial () Sim () Não

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____

Hipercolesterolemia () Sim () Não

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____

Doenças autoimunes () Sim () Não

Qual: _____

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____

Diabetes () Sim () Não

() Tipo I () Tipo II

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____

Doenças intestinais () Sim () Não

Qual: _____

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____

Doenças respiratórias () Sim () Não

Qual: _____

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____

Outras doenças () Sim () Não

Qual(is): _____

Em tratamento regular? () Sim () Não

Medicamento/dose: _____



RGH: _____

ID Paciente: _____

4. FAZ USO DE OUTROS MEDICAMENTOS? () Sim () NãoQual(is)/dose/a quanto tempo? _____
_____**5. CIRURGIAS ANTERIORES?** () Sim () NãoQual(is)? _____
_____**6. PRÁTICA ATIVIDADES FÍSICAS?** () Sim () Não

() 2x por semana () 3x ou mais por semana () Irregularmente

Qual(is)? _____ Há quanto tempo pratica exercício: _____

7. HISTÓRICO DE CÂNCER NA FAMÍLIA? () Sim () Não

Tipo de câncer	Grau de parentesco

8. FAZ USO DE PROBIÓTICOS DIARIAMENTE/ CONSUMIU PROBIÓTICOS NO ÚLTIMO MÊS?

(Ex.: Probiatop®, SimFort®, Simbiotil®, Florativ®, ProVance®, Floratil®, Lactivos®, Lactopro®, Yakult®, Activia®, Actimel®, kefir, kombucha, etc)

() Sim () Não Se sim, qual? _____

9. FAZ USO DE PREBIÓTICOS DIARIAMENTE/ CONSUMIU PREBIÓTICOS NO ÚLTIMO MÊS? (Ex.: Prolive®, lactulose, frutooligosacarídeos [FOS], inulina, etc.)

() Sim () Não Se sim, qual? _____

10. FEZ USO DE ANTIBIÓTICO NOS ÚLTIMOS 3 MESES?

() Sim () Não Se sim, qual? _____

11. FEZ USO DE ANTI-INFLAMATÓRIO NOS ÚLTIMOS 3 MESES?

() Sim () Não Se sim, qual? _____



RGH: _____

ID Paciente: _____

12. FEZ OU FAZ USO REGULAR DE INIBIDORES DE BOMBA / ANTI-ACIDOS (pantoprazol, omeprazol, outros)?

() Sim () Não Se sim, qual? _____

13. FAZ OU JÁ FEZ USO REGULAR DE ASPIRINA?

() Sim () Não

14. JÁ TEVE CÂNCER?

() Sim () Não Se sim, qual? _____

Qual(is) o(s) tratamento(s):

() Radioterapia () Quimioterapia () Radioquimioterapia () Outros: _____

Há quanto tempo teve este câncer? _____

Há quanto tempo finalizou o tratamento? _____

15. ALIMENTAÇÃO

Faz dieta vegetariana? () Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Faz dieta vegana? () Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Faz alguma dieta especial, evitando ou consumindo preferencialmente algum alimento?

() Sim () Não

Qual dieta/alimento? _____

Quanto tempo? _____

Doces (bolos, biscoitos recheados, bolachas, waffer, amanteigado, bombom, chocolate, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Alimentos com farinha branca (pão, macarrão, pizza, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Vegetais amiláceos (Ex.: batata, batata doce, mandioca, inhame, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana



RGH: _____

ID Paciente: _____

Vegetais não amiláceos (Ex.: abobrinha, berinjela, tomate, couve-flor, brócolis, beterraba, cenoura, pepino, aspargo, palmito, chuchu, vagem, rabanete, abobora, nabo, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Folhas (Ex.: alface, acelga, couve, espinafre, escarola, rúcula, agrião, repolho, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Frutas/vitamina de frutas (Ex.: abacaxi, banana, mamão, manga, laranja, mexerica, caqui, carambola, goiaba, kiwi, maçã, melão, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Leguminosas (Ex.: feijão, ervilha, lentilha, grão de bico, soja, milho, tremçoço, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Cereais ricos em fibra (Ex.: chia, aveia, linhaça, quinoa, arroz integral, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Laticínios (Ex.: leite, iogurte, queijos, bebidas lácteas, leite fermentado, requeijão, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Peixe

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Frango

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Carne vermelha (Ex.: carne de vaca, porco, cordeiro, cabra, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Carnes processadas (transformada por salga, cura, fermentação, defumação e outros processos para realçar sabor ou melhorar a preservação. Ex.: salame, salsicha, peito de peru, presunto, carne seca, linguiça, etc)

() não consumo () 1x por semana () 2x por semana () 3x ou mais por semana

Algum outro alimento de consumo diário que não está listado acima?

Qual? _____