



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



PPGIBA

Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada

METILAÇÃO DE DNA E CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS EM PACIENTES
COM CÂNCER COLORRETAL ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO CENTRO DE
CONTROLE DE ONCOLOGIA DO AMAZONAS – FCECON

FLÁVIA NÍNIVER DE OLIVEIRA GOMES

MANAUS

2025



UFAM

FLÁVIA NÍNIVER DE OLIVEIRA GOMES



METILAÇÃO DE DNA E CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS EM PACIENTES
COM CÂNCER COLORRETAL ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO CENTRO DE
CONTROLE DE ONCOLOGIA DO AMAZONAS – FCECON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Kátia Luz Torres Silva.

Coorientadora: Prof^ª Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins.

MANAUS

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633m Gomes , Flávia Niniver de Oliveira
Metilação de DNA e Concentrações de citocinas em Pacientes com
Câncer Colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Amazonas – FCEcon. / Flávia Niniver de Oliveira Gomes . - 2025.
99 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Kátia Luz Torres Silva.
Coorientador(a): Valquíria do Carmo Alves Martins.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2025.

1. Câncer colorretal. 2. Metilação. 3. Citocinas. 4. Amazonas. I. Silva,
Kátia Luz Torres. II. Martins, Valquíria do Carmo Alves. III. Universidade
Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica
e Aplicada. IV. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes com câncer colorretal, que mesmo diante da doença, demonstraram uma força e resiliência inspiradoras, e tornaram possível a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por nunca me abandonar e por sempre direcionar o meu caminho, me dando força e coragem todos os dias para alcançar meus objetivos.

Ao meu marido, **Flávio Rosemberg** que sempre apoiou os meus sonhos, incentivou e orou, compartilhando cada desafio e vitória desta trajetória.

Aos meu pais, **Alcilene Gama** e **Favero de Oliveira** e minha mãe/avó **Lourdes Gama**, minhas bases de inspiração.

À minha sogra **Danielle Gomes**, meus cunhados **Vitória Gomes** e **Jonatas Barbosa**, por estarem ao meu lado e tornarem essa jornada mais leve e feliz.

Aos meus amigos e parceiros de profissão **Felipe Luz**, **Jessica Burlamaque** e **Lorena Lemos**, que são fonte de inspiração, parceria e apoio.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. **Kátia Luz Torres Silva**, que me incentivou a trilhar esse caminho na ciência, e deu todo o suporte necessário seja em dias de alegria ou de angústia. Um ser humano de muita luz, sabedoria e serenidade. Poucas são as pessoas que tem o prazer de conviver com alguém assim e que sorte a minha ter encontrado a senhora nesta caminhada. Muito obrigada por me ouvir, aconselhar, ensinar e não soltar as minhas mãos. A sua orientação foi fundamental para que este sonho se tornasse realidade.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a **Valquíria do Carmo**, que foi essencial nesta trajetória, dedicou o seu tempo a me ensinar a biologia molecular, com orientações sempre muito pertinentes. Obrigada por todo apoio, incentivo e confiança. Esta conquista é o reflexo de sua dedicação e paciência.

A **Josiane Neves**, **Cibele Menezes**, grandes amigas, que transformaram os desafios desta jornada em momentos de leveza e alegria.

A **Mikele Praia, Heidy Halanna** minhas amigas, parceiras de laboratório e estudos, o apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus Paic's do coração **Bruna Campos, Fernando Raid, Livia Gusmão, Lawren Brito, Rebeca Amanda**. Vocês foram essenciais para a execução deste trabalho, sempre muito solícitos e proativos.

Às Dras. **Dieila Giomo de Lima e Mariana Brait**, pela valiosa colaboração nas etapas de validação das curvas e no aperfeiçoamento dos protocolos, cuja dedicação e expertise foram fundamentais para o êxito deste trabalho.

A **Diretoria de ensino e pesquisa da FCEcon**, por todo apoio administrativo que tornou a condução deste estudo possível e bem-sucedida.

A todo o corpo docente e administrativo do **Programa de Imunologia Básica e Aplicada da UFAM**, aos professores pelos ensinamentos e aos secretários por todos os esclarecimentos de dúvidas e por toda a cordialidade

A **Fundação Centro de Controle em Oncologia do Estado do Amazonas**, instituição na qual desenvolvi o projeto por ceder o espaço para desenvolver a pesquisa e a todos os profissionais que, com seu conhecimento e dedicação, tornaram este trabalho possível.

A **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**, por nos receber para realização em análises em citometria de fluxo, e aos pesquisadores Prof. Dr. **Alysson Guimarães, Claudio Lucas, Estela Yasmin**, por todo ensinamento e suporte.

Por fim, agradeço a todos que, com seu apoio e conhecimento, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais incidente no mundo e o segundo em mortalidade. Sua complexa carcinogênese é marcada por alterações epigenéticas, como a metilação das ilhas CpG (fenótipo CIMP), e por fatores de risco relacionados ao estilo de vida que promovem um estado inflamatório crônico favorável à progressão tumoral. Este estudo transversal, descritivo e analítico teve como objetivo descrever a frequência de fenótipos de hipermetilação tecidual e avaliar o perfil de citocinas séricas em pacientes com câncer colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), além de analisar dados sociodemográficos, clínicos e patológicos dos 59 pacientes incluídos. A análise de metilação foi realizada por qPCR utilizando painéis de genes-alvo, e a quantificação de citocinas por citometria de fluxo. Nas amostras teciduais (N=35), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na metilação dos genes CDKN2A e RUNX3, sugerindo heterogeneidade epigenética. Nas amostras de plasma (N=57), o perfil de citocinas apresentou resultados distintos: concentrações mais elevadas de IL-10 em tumores de cólon esquerdo, IL-17A em cólon direito, IL-6 em estágios avançados e IL-8 na presença de metástase. No subgrupo de 35 pacientes, observou-se correlação negativa entre a metilação de RUNX3 e os níveis de IL-2, além de correlações positivas entre os pares IL-6/IL8, IL-6/IL-12p70, IL-1 β /TNF e IL-4/IFN- γ . A análise de regressão múltipla indicou que IL-10 foi preditora independente da localização tumoral. Esses achados reforçam a interação entre mecanismos epigenéticos e imunes no CCR, sugerindo caminhos promissores para futuras investigações que aprofundem a compreensão dos mecanismos moleculares da doença.

Palavras chaves: câncer colorretal; metilação; citocinas; Amazonas.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer mortality. Its complex carcinogenesis is marked by epigenetic alterations, such as CpG island methylation (CIMP phenotype), and lifestyle-related risk factors that promote a chronic inflammatory state favorable to tumor progression. This cross-sectional, descriptive, and analytical study aimed to describe the frequency of tissue hypermethylation phenotypes and evaluate the serum cytokine profile in patients with colorectal cancer treated at the Amazonas Oncology Control Center Foundation (FCECON), in addition to analyzing sociodemographic, clinical, and pathological data from the 59 patients included. Methylation analysis was performed by qPCR using target gene panels, and cytokine quantification by flow cytometry. In tissue samples (N=35), no statistically significant differences were observed in the methylation of the CDKN2A and RUNX3 genes, suggesting epigenetic heterogeneity. In plasma samples (N=57), the cytokine profile showed distinct results: higher concentrations of IL-10 in left colon tumors, IL-17A in right colon tumors, IL-6 in advanced stages, and IL-8 in the presence of metastasis. In the subgroup of 35 patients, a negative correlation was observed between RUNX3 methylation and IL-2 levels, as well as positive correlations between the IL-6/IL8, IL-6/IL-12p70, IL-1 β /TNF and IL-4/IFN- γ pairs. Multiple regression analysis indicated that IL-10 was an independent predictor of tumor location. These findings reinforce the interaction between epigenetic and immune mechanisms in CRC, suggesting promising avenues for future investigations to deepen the understanding of the molecular mechanisms of the disease.

Keywords: colorectal cancer; methylation; cytokine; Amazonas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação do cólon (ascendente, transverso, descendente, sigmoide) e reto....	22
Figura 2. Sequência convencional ilustrativa de adenoma-carcinoma.....	23
Figura 3. Diferenças de metilação de DNA da ilha CpG em célula normal e cancerosa. As hastes abertas representam sítios CpG não metilados, enquanto as hastes fechadas representam ilhas CpG hipermetiladas em regiões promotoras de genes, provocando o silenciamento transcricional..	28
Figura 4. Diferenças evolutivas e funcionais entre inflamação durante uma infecção com regeneração tecidual e inflamação no câncer impulsionada por proliferação excessiva de citocinas inflamatórias que facilitam o crescimento do tumor.	32
Figura 5. Teste de eficiência de primers e sondas: a) Teste com DNA 100% metilado b) Teste com DNA não metilado.	44
Figura 6. Fluxograma de amostras incluídas no estudo.	48
Figura 7. Gráfico de pontos pareados que exhibe os níveis de metilação de CDKN2A (log10-transformados) em amostras pareadas de tecidos não-tumorais (azul) e tumorais (vermelho). As diferenças na porcentagem de metilação entre os tecidos não-tumorais e tumorais, foram analisadas usando o teste não paramétrico de Wilcoxon. As linhas pretas conectam as amostras do mesmo paciente. O p-valor (0.305) do teste indica que não houve diferença estatística entre os grupos. A linha tracejada roxa representa o limiar ideal de -2.48 (0,0033% na escala original), determinado pela análise ROC para melhor discriminação (Sensibilidade = 54.29%; Especificidade = 88.57%).....	54
Figura 8. Gráfico de pontos pareados que exhibe os níveis de metilação de RUNX3 (log10-transformados) em amostras pareadas de tecidos não-tumorais (azul) e tumorais (vermelho). As diferenças na porcentagem de metilação entre os tecidos não-tumorais e tumorais, foram analisadas usando o teste não paramétrico de Wilcoxon. As linhas pretas conectam as amostras do mesmo paciente. O p-valor (0.418) do teste indica que não houve diferença estatística entre os grupos. Um gráfico de suporte para esta análise está disponível no Apêndice 9.2.....	55
Figura 9. Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a lateralidade do cólon: direito (D) versus esquerdo (E). Os valores estão expressos em pg/mL. Os dados são representados em Boxplot com pontos individuais. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas representadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).	57

Figura 10. Concentrações plasmáticas de citocinas nos pacientes com câncer colorretal (CCR) por estadiamento da doença. Os valores estão expressos em pg/mL. Os dados são representados por Box Plots com pontos individuais. As análises estatísticas foram realizadas por Kruskal-Wallis (com pós-teste de Dunn) para os dados não-normais. Diferenças significativas foram destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*). 58

Figura 11. Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a presença ou ausência de metástase. Os valores estão expressos em pg/mL. Os dados são representados em Boxplot com pontos individuais. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são representadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*). 59

Figura 12. Mapa de calor da correlação de Spearman entre níveis de metilação dos genes CDKN2A e RUNX3 e as concentrações séricas de citocinas. Os círculos coloridos representam os coeficientes de correlação (ρ), onde a cor e o tamanho do círculo indicam a força e a direção da associação. Tons de azul indicam correlação negativa e tons de laranja indicam correlação positiva. Círculos em branco representam correlações não estatisticamente significativas ($p > 0.05$). 61

Figura 13. Mapa de calor dos coeficientes beta da análise de regressão linear múltipla. O gráfico representa os coeficientes de regressão (β) de um modelo multivariado, mostrando a influência das variáveis clínicas, patológicas, níveis de metilação de genes (linhas) e citocinas (colunas). A intensidade da cor laranja indica a magnitude do coeficiente beta. O asterisco (*) destaca uma associação estatisticamente significativa com $p < 0,05$ 62

Figura 14. Curva ROC para a metilação do gene CDKN2A. A curva ilustra a sensibilidade versus a especificidade do teste, e a Área sob a Curva (AUC) de 0,583 indica a capacidade preditiva da metilação do gene em distinguir entre os grupos analisados no estudo. 85

Figura 15. Curva ROC para a metilação do gene RUNX3. A curva ilustra a sensibilidade versus a especificidade do teste, e a Área sob a Curva (AUC) 0,496 onde indica que a metilação do gene não possui uma capacidade preditiva para diferenciar os grupos analisados no estudo. . 85

Figura 16. Níveis de metilação do gene RUNX3 entre grupos de pacientes. O gráfico de dispersão com jitter horizontal ilustra a distribuição dos níveis de metilação em uma escala logarítmica (log_Metilação) no tecido tumoral e não-tumoral. Cada ponto representa um paciente, e o jitter é usado para evitar a sobreposição de pontos com valores idênticos. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas, epidemiológicas dos pacientes com câncer colorretal, atendidos na FCECON no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024 Amazonas, Brasil.....	49
Tabela 2. Características de estilo de vida dos pacientes com câncer colorretal, atendidos na FCECON, no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024, Amazonas, Brasil.....	50
Tabela 3. Sintomas relatados pelos pacientes diagnosticados com câncer colorretal, atendidos na FCECON, no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024, Amazonas, Brasil.....	51
Tabela 4. Características clínicas e patológicas dos pacientes diagnosticado com câncer colorretal, atendidos na FCECON, no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024, Amazonas, Brasil.....	52
Tabela 5. Parâmetros das curvas padrão obtidas para os genes-alvo utilizados na padronização da reação de qPCR.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação geral do estágio de câncer colorretal, conforme o sistema TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC).	24
Quadro 2. Variáveis analisadas no estudo	40
Quadro 3. Sequência de primers e sondas específicos para metilação de DNA.	43
Quadro 4. Componentes da reação de metilação em qPCR.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BRAF	B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
CCR	Câncer colorretal
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CDO1	cisteína dioxigenase tipo 1
CDs	Células dendríticas
CH ₃	Grupo metil
CIMP	Fenótipo metilador da ilha CpG
CIMP-H	CIMP-Hight
CIMP-L	CIMP-Low
CRABP1	Proteína ligadora do ácido retinóico celular 1
Cs	Citocinas
CMS	Subtipo molecular de consenso
DAMPs	Padrão molecular associado a danos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3	DNA metiltransferase 3
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
EPCAM	Molécula de adesão de células epiteliais
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas
FHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
FFPE	Técnica padrão de preservação de amostras de tecido
Gs	Guaninas
GSK3 β	Receptor beta 2 do fator de crescimento transformador
HR	Proporção de perigos
H ₂ O	Elemento químico - água

HIC1	Gene silenciado por metilação
HOXA9	Gene silenciado por metilação
IC	Índice de confiança
ICI	Check-point imune
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IECs	Células epiteliais intestinais
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1 beta
INC	Chromosomal instability
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IMC	Índice de massa corporal
KRAS	Oncogene Kirsten Ras
M2	Macrófagos 2
MAT	Microambiente tumoral
mg	miligrama
MYC	Proto-oncogene e codifica uma fosfoproteína nuclear
MSI	Instabilidade de Microsatélite
MMR	Mismatch Repair
mL	mililitros
MLH1	MutL homolog 1
mm	milímetros
MSH-2	MutS homolog 2
MSH-6	MutS homolog 6
MDSC	Células supressoras derivadas de Mieloide
NEUROG1	Neurogenina 1
NF-kB	Fator nuclear kappa B
ng	nanograma

OR	Razão de chances
PAF	Polipose adenomatosa familiar
PIK3CA	Subunidade catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PMS2	homolog 2, componente do sistema de reparo de incompatibilidade
PPT	Plasm preparations tube
RUNX3	Fator de transcrição 3 da família RUNX
REGESAM	Rede de Genômica e Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SL	Síndrome de Lynch
SMAD4	gene codifica um membro da família Smad de proteínas de transdução de sinal.
SOCS1	Supressor da sinalização de citocinas 1
SOE	Sem outras especificações
Th1	células T auxiliares 1
Th2	células T auxiliares 2
Th17	células T auxiliares 17
T CD4	Células T auxiliar
T CD8	Células T citotóxicas
TGFβ	Fator de crescimento transformador β
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TGFBR2	Receptor beta 2 do fator de crescimento transformador
TNM	Classificação de Tumores Malignos
TME	Microambiente tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
WNT	Via de sinalização Wingless/Integrated-1
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
μl	microlitro
%	porcentagem
f ⁱ	Frequência relativa
°C	Graus celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Epidemiologia do câncer de colorretal	21
2.2	Câncer colorretal (CCR): fatores de risco, diagnóstico e tratamento	21
2.3	Carcinogênese do câncer colorretal	25
2.4	Metilação de DNA em ilhas CpG	27
2.5	PCR em tempo real para análise de metilação no câncer colorretal.....	30
2.6	Inflamação no câncer colorretal	31
2.7	O papel das citocinas no câncer colorretal	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral:	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	MÉTODOS.....	38
4.1	Tipo do estudo	38
4.2	Local do estudo.....	38
4.3	População do estudo	38
4.4	Amostragem	38
4.5	CrITÉRIOS de elegibilidade.....	39
4.5.1	CrITÉRIOS de inclusão	39
4.5.2	CrITÉRIOS de exclusão	39
4.6	Coleta de amostras e análises laboratoriais	40
4.6.1	Abordagem aos pacientes	40
4.6.2	Coleta do sangue periférico e obtenção de plasma.....	41
4.6.3	Coleta de peça cirúrgica ou biópsia	41
4.6.4	Extração de DNA.....	41

4.6.5	Quantificação de DNA	42
4.6.6	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	42
4.6.7	Seleção de genes alvos e os respectivos Primers e Sondas	42
4.6.8	Análise do padrão de fenótipo de metilação por qPCR.....	44
4.6.9	Análise de citocinas séricas	46
4.6.10	Análises Estatísticas.....	46
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Características sociodemográficas epidemiológicas	48
5.2	Características de estilo de vida	49
5.3	Características clínicas e patológicas	51
5.4	Padrão de Metilação de genes alvos em tecido não tumoral e tumoral	53
5.5	Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a lateralidade do tumor (direito versus esquerdo).	56
5.6	Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com o estadiamento da doença.	57
5.7	Concentrações plasmáticas de citocinas em relação a ausência ou presença de metástase.	59
5.8	Correlação entre o padrão de metilação e citocinas.	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES.....	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9	APÊNDICE	85
9.1	Curva ROC para metilação dos genes CDKN2A e RUNX	85
9.2	Gráfico de teste RUNX3 com Jitter.....	86
10	ANEXOS	87
10.1	Classificação em CIMP high ou low baseada nos CpGs presentes em ilhas de genes	87
10.2	Aprovação do projeto pelo comitê de ética	88

10.3	Termo de Consentimento livre e esclarecido -TCLE	94
10.4	Formulário de coleta de dados.....	98

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais frequente em todo o mundo com uma incidência de mais de 1,9 milhões de casos novos e o segundo maior em números de mortes com estimativa de 935 mil mortes em 2020 (Sung *et al.*, 2021).

No Brasil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, o CCR ocupa a terceira posição de câncer mais frequente. Estima-se um risco de 21,10 casos novos a cada 100 mil habitantes para cada ano do triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2023).

No Amazonas, o CCR é o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado e as estimativas por sexo indicam que as mulheres são mais suscetíveis ao CCR, correspondendo a uma taxa de incidência de 7,47 casos, a cada 100 mil mulheres, enquanto os homens correspondem a 6,20 casos a cada 100 mil homens. Em Manaus, as estimativas demonstram que a taxa bruta de incidência de casos de CCR são de 11,55 e 8,81 casos a cada 100 mulheres e homens, respectivamente (INCA, 2023).

O CCR é uma doença caracterizada pelo acúmulo sucessivo de alterações genéticas e ou epigenéticas, algumas das quais são responsáveis pela ativação da oncogênese ou inativação de genes oncosuppressores capazes de conduzir a evolução maligna do epitélio normal para lesões neoplásicas precoces (De Palma *et al.*, 2019).

Pelo menos três vias moleculares principais são descritas para o desenvolvimento do CCR, sendo a instabilidade cromossômica, caracterizada por aneuploidia ou anormalidades cromossômicas estruturais, instabilidade de microsatélites (MSI) que é causada pela disfunção dos genes de reparo de incompatibilidade do DNA e a metilação da ilha CpG, um mecanismo epigenético no qual há uma adição de um grupo metil (CH₃) no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas pela ação de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (Harada; Morlote, 2020).

Nas últimas décadas, foram descritos vários fatores de risco modificáveis e não modificáveis que aumentam ou diminuem o risco do desenvolvimento do CCR. Dentre eles, são citados os fatores ambientais e estilo de vida como responsáveis pelo aumento do desenvolvimento do CCR. Os quais inclui a obesidade, inatividade física, dieta inadequada, tabagismo e consumo de álcool (Ionescu *et al.*, 2023; Rawla; Sunkara; Barsouk, 2019).

Além disso, certos componentes da dieta (referidas como dietas inflamatórias) têm influência no estado inflamatório gastrointestinal e sistêmico, levando o aumento de níveis de

citocinas como interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral TNF- α . Esses mediadores inflamatórios podem atuar como fatores pró-oncogênicos por meio da ativação de vias de sinalização oncogênica (Czajka-Francuz *et al.*, 2021; Liu, Li *et al.*, 2017).

A inflamação pode iniciar a tumorigênese através de danos no DNA na ausência de quaisquer carcinógenos exógenos, bem como pode afetar genes relacionados ao câncer através de mecanismos epigenéticos que resultam no silenciamento de importantes genes supressores tumorais (Maiuri; O'Hagan, 2016). Por exemplo, IL-1 β , IL-6 e TNF- α controlam a expressão das DNA metiltransferases DNMT1 e DNMT3, levando assim a alterações no padrão de metilação e expressão de genes envolvidos nas vias de CCR (Grivennikov, 2013; Li, J. *et al.*, 2020).

Sabe-se ainda que em mamíferos, a metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em citosinas (Cs) que são seguidas de guaninas (Gs), chamado de dinucleotídeo CpG. Muitos CpG's são encontrados no que são conhecidas como ilhas CpG e estas tendem a ser encontradas nos promotores de genes. A regra geral é que as ilhas CpG, tendem a ser protegidas da metilação. No entanto, se for encontrado metilação nas ilhas CpG em regiões de genes supressores de tumor, isto induz a inibição dos fatores de transcrição promovendo o silenciamento da expressão gênica (Illingworth; Bird, 2009; Edwards *et al.*, 2017).

Então no câncer, em vez de se observar o mesmo tipo de composição de metilação do DNA que se têm em uma célula normal, as ilhas CpG são hipermetiladas e quando associado ao promotor de genes supressores de tumor causa a inativação transcricional desses genes e leva ao desenvolvimento e progressão do câncer (Gokul; Khosla, 2013; Jin; Liu, 2018).

Nesse contexto, o presente estudo visa investigar o perfil de metilação de genes alvos, bem como as concentrações séricas de citocinas inflamatórias em pacientes com câncer colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), buscando ampliar o entendimento das interações entre os mecanismos epigenéticos e imunológicos no microambiente tumoral e sua possível relação com características clínicas e patológicas da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia do câncer de colorretal

O câncer colorretal (CCR) é um problema de saúde global, sendo o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado e o segundo maior em números de mortes. Com estimativa de 1,9 milhão de casos novos e 935 mil mortes (Sung *et al.*, 2021).

No Brasil, no ano de 2023, foram estimados 45.630 casos novos de CCR, uma incidência de 11,43 (taxa ajustada) casos a cada 100 mil habitantes. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2020, em termos de mortalidade, ocorreram 20.245 óbitos, incidência de 9,56 óbitos a cada 100 mil habitantes. Na região Norte, a incidência de CCR foi de 8,04 (taxa ajustada) casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2023).

No Amazonas, o CCR é o quarto câncer mais frequente nos homens, com estimativa de 6,20 casos a cada 100 mil homens e em mulheres é o terceiro mais frequente, sendo 7,47 por 100 mil mulheres. Na Capital do Amazonas, Manaus, o CCR ocupa as mesmas posições de incidência quando comparado por gênero, com 8,81 casos a cada 100 mil homens e 11,55 casos a cada 100 mil mulheres, respectivamente (INCA, 2023).

O CCR pode ser considerado um marcador de desenvolvimento socioeconômico e as taxas de incidência tendem a aumentar uniformemente com o aumento do índice de desenvolvimento humano (IDH) e varia significativamente entre as regiões do mundo, bem como os diferentes grupos de idade, gênero e raça. Isso envolve múltiplas causas, incluindo fatores de risco associados ao estilo de vida, variações demográficas, suscetibilidade genética, mutações genéticas e seu efeito prognóstico e respostas ao tratamento (Baidoun *et al.*, 2020).

2.2 Câncer colorretal (CCR): fatores de risco, diagnóstico e tratamento

O CCR é uma doença multifatorial e heterogênea que acomete o intestino grosso (cólon e/ou reto). O cólon e o reto são órgãos do trato gastrointestinal, responsável por decompor os macronutrientes para a absorção pelo organismo. No estômago, os alimentos são submetidos a uma quebra mecânica e química, tornando-se uma massa semissólida. No intestino delgado, quase todos os nutrientes são absorvidos na corrente sanguínea. No intestino grosso, a água e os sais são removidos dos alimentos não digeridos à medida que passam pelo cólon até que saiam do corpo passando pelo reto e chegando ânus. O cólon é a parte mais longa dividida em

quatro seções: cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide. O reto está próximo a extremidade do intestino grosso (figura 1) (NCCN, 2021).

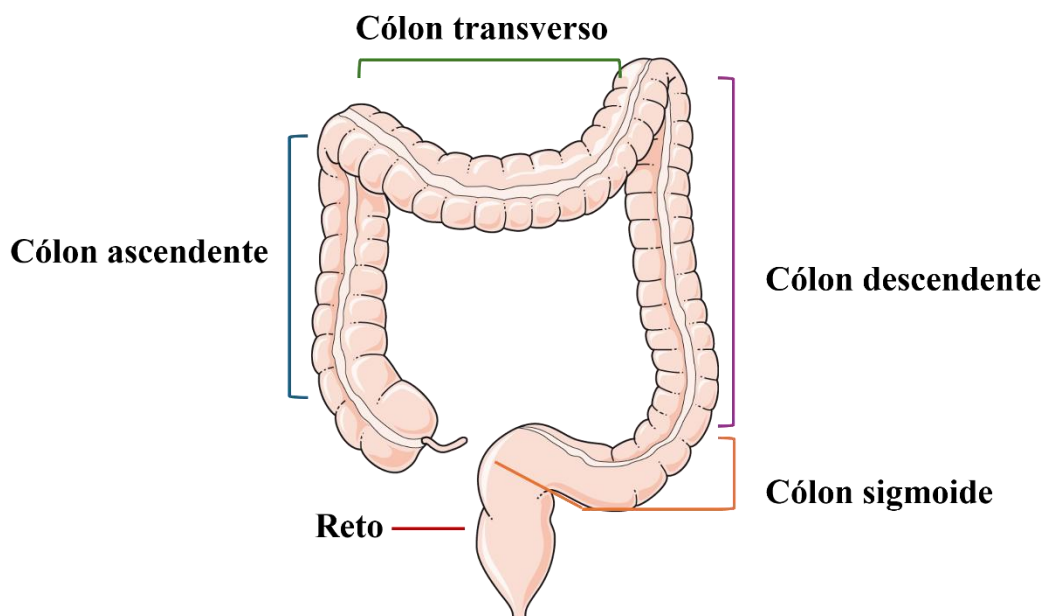


Figura 1. Representação do cólon (ascendente, transverso, descendente, sigmoide) e reto. Fonte: Elaborado pela autora. **Fonte:** Servier Medical Art com adaptações.

A evolução das células epiteliais normais para o adenocarcinoma segue em geral uma progressão previsível de alterações histológicas, genéticas e epigenéticas que começa com uma cripta aberrante, evoluindo para uma neoplasia (lesão precursora), um pólip, seguindo para um adenoma precoce. O adenoma precoce então progride para um adenoma avançado, antes finalmente de se tornar um CCR (figura 2) (Kuipers *et al.*, 2015; De Palma *et al.*, 2019). Apenas 10% de todos os adenomas progridem para câncer invasivo, conhecido como adenocarcinoma e corresponde a 96% de todos os CCRs (Stewart *et al.*, 2006).

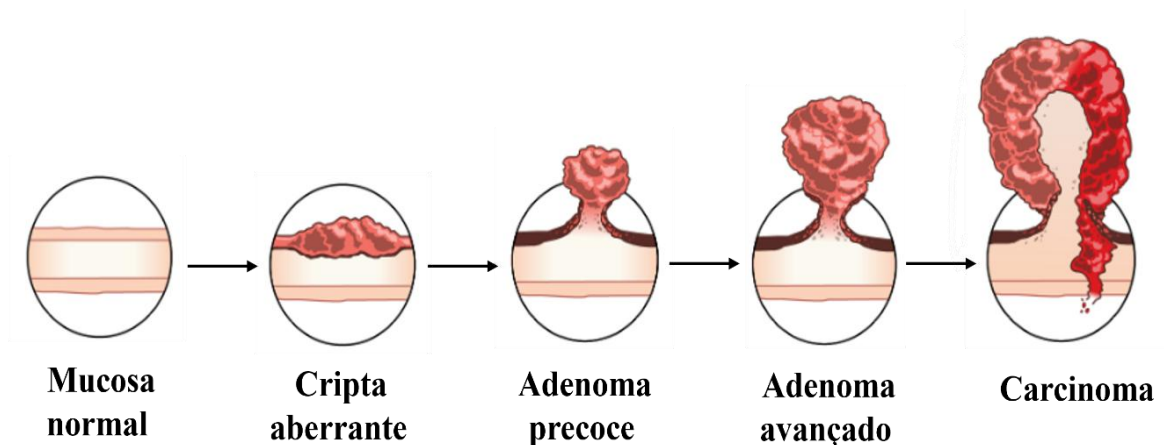


Figura 2. Sequência convencional ilustrativa de adenoma-carcinoma. Fonte: Adaptado de De Palma *et al.*, 2019.

Essa transformação maligna requer até 15 anos para ocorrer, dependendo das características da lesão e de outros fatores de risco independentes, como idade, sexo, peso corporal, índice de massa corporal, sedentarismo, obesidade, consumo de álcool, tabagismo, ingestão de carnes vermelhas e processadas (Kuipers; Rösch; Bretthauer, 2013; Aljama *et al.*, 2023; Pacheco-Pérez *et al.*, 2019). Além disso, há outros fatores de risco associados a condições genéticas e/ou hereditárias devido a síndromes de suscetibilidade incomuns ou raras, de alto risco, como a síndrome de Lynch (SL) (3-4%) e a polipose adenomatosa familiar (PAF) (1%) (Whiffin *et al.*, 2014), ou ainda por consequências de doenças inflamatórias intestinais (1%-2%) (Munkholm, 2003).

O rastreamento do câncer colorretal, quando adotado como ação de saúde pública em alguns países, é iniciado próximo aos 45 anos de idade, dependendo da estratégia utilizada. Essa recomendação de idade, no entanto, é flexibilizada para aqueles com risco aumentado, como nos casos relacionados a hereditariedade, fatores genéticos e doenças inflamatórias intestinais, cujo rastreio deve ser feito antes dos 45 anos, a partir de realizações de exames, sendo os mais comuns o de sangue oculto nas fezes, a retossigmoidoscopia flexível ou a colonoscopia (AJCC, 2017; NCCN, 2021).

Embora a pesquisa de sangue oculto nas fezes seja uma das principais ferramentas para a detecção precoce do câncer colorretal em adultos entre 50 e 75 anos (BRASIL, 2010), o Brasil não possui uma diretriz nacional de rastreamento populacional. Em vez disso, a estratégia do Sistema Único de Saúde (SUS) é que sejam priorizadas ações de diagnóstico precoce e abordagem personalizada para o grupo de alto risco (INCA, 2021).

A suspeita de CCR e o encaminhamento para diagnóstico definitivo estão relacionados à ocorrência de sangramento retal, massa abdominal, dor abdominal, alteração do hábito intestinal, perda de peso inexplicada e anemia ferropriva (Sawicki *et al.*, 2021). O diagnóstico então é realizado através do exame de colonoscopia que possui maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico. Além disso, permite avaliar todo o intestino grosso e a parte terminal do intestino delgado, bem como realizar a amostragem simultânea de biópsia e, portanto, a confirmação histológica do diagnóstico e material para perfil molecular (Issa IA; Nouredine M., 2017).

Após o diagnóstico, a realização de exames para o estadiamento da doença é fundamental. A progressão do câncer colorretal é definida em uma escala de estágios, que se inicia no estágio 0 (considerado um câncer muito precoce). A partir do estágio I, o número aumenta progressivamente até o estágio IV, indicando que a doença se tornou mais invasiva e se espalhou para outras partes do corpo (AJCC, 2017).

Dessa forma o CCR é classificado de acordo com a profundidade de invasão local (T=Tumor, N=Linfonodo, M=Metástases). O estadiamento TNM é baseado no nível de penetração da parede intestinal, número de linfonodos comprometidos e presença ou não de metástase a distância (Quadro 1) (AJCC, 2017). O sistema de estadiamento é fundamental para prever a evolução do câncer e auxiliar na definição das melhores opções de tratamento. (Yau, 2019).

Quadro 1. Classificação geral do estágio de câncer colorretal, conforme o sistema TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Estágio AJCC	TNM	Descrição
0	Tis, N0, M0	Carcinoma muito precoce, restrito a camada interna (mucosa) no cólon ou reto.
I	T1-T2, N0, M0	O tumor cresceu para a submucosa ou muscular própria, mas não se espalhou para linfonodos próximos ou locais distantes.
II	T3-T4, N0, M0	O tumor invadiu além da camada muscular podendo ter crescido através da parede do cólon ou reto, mas não se espalhou para linfonodos próximos.
III	Qualquer T, N1-N2, M0	O tumor se espalhou para um ou mais linfonodos próximos, mas não para locais distantes. O tamanho e a extensão do tumor podem variar.
IV	Qualquer T, Qualquer N, M1	O tumor se espalhou para outros órgãos ou tecidos distantes (metástase), como fígado, pulmões ou o peritônio.

Fonte: American Joint Committee on Cancer., 2017.

O tratamento do CCR vai depender do tamanho, localização, extensão do tumor e da saúde geral do paciente. Sendo os tratamentos mais convencionais a cirurgia, quimioterapia e a radioterapia que podem ser usados em combinação. Para pacientes em estadiamento inicial, a cirurgia é a primeira alternativa, já aqueles em estadiamento mais avançado, além da cirurgia é necessário tratamentos adicionais como a quimioterapia e/ou a radioterapia neoadjuvante (Haraldsdóttir; Hálfðanarson, 2014).

Sobretudo, nem toda condição do paciente é a mesma, e as decisões de tratamento com base apenas no estadiamento são simplistas. Por isso, muito se fala sobre a medicina de precisão que vai além de um modelo convencional de medicamento, mas que usa características baseadas no ambiente, estilo de vida, de estadiamento e biológicas específicas para identificar qual a abordagem será mais eficaz para o paciente em particular, aumentando assim a probabilidade de resposta ao tratamento e menos efeitos adversos aos medicamentos (Yau, 2019).

Ademais, a imunoterapia oncológica também é uma das alternativas para o tratamento do câncer, e vem ganhando espaço em comparação com o tratamento padrão, pois este tipo de tratamento manipula e utiliza o próprio sistema imunológico do paciente no combate das células cancerígenas. Sendo principalmente utilizados os inibidores de *check-point* imune (ICI), vacinas contra o câncer e terapia celular adotiva (Johdi; Sukor, 2020).

2.3 Carcinogênese do câncer colorretal

A carcinogênese do CCR se deve ao acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas, as quais são responsáveis pela evolução maligna do epitélio normal através de lesões neoplásicas precoces até ao CCR (Bogaert; Prenen, 2014; Wong; Xie, 2017).

Há duas vias principais de lesão precursora do CCR: a via tradicional adenoma-carcinoma que leva a 70-90% do CCR e a via serrilhada que representa 10-20% do CCR, estas vias representam múltiplos eventos genéticos e epigenéticos (Dekker *et al.*, 2019).

A via adenoma-carcinoma segue a via convencional de instabilidade cromossômica (CIN do inglês, *chromosomal instability*). A CIN consiste em um ganho ou perda de todo ou parte dos cromossomos e apresentam mutações em oncogenes específicos e/ ou genes supressores de tumor como APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma*), PIK3CA (*Phosphatidyl Inositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, Catalytic Alpha*), BRAF (*B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), SMAD4 (*Son of Mothers Against Decapentaplegic 4*) ou TP53 (*Tumor Protein 53*) Brenner; Kloor; Pox, 2014; Schmitt; Greten, 2021). Em contraste a

via CIN, o CCR também pode ser desenvolvido por vias hipermutáveis, caracterizadas por frequentes mutações no par de bases do DNA somático, sendo a via MSI (MSI do inglês, *microsatellite instability*) o mecanismo primário desse fenótipo hipermutável detectado em 85% dos CCRs ou a instabilidade de microssatélites presente em 15% dos CCRs esporádicos. De modo geral, mutações em genes de reparo de incompatibilidade de DNA (MMR- *Mismatch Repair*.) (MLH1- *MutL Homolog 1*, MSH-2 - *MutS Homolog 2*, MSH6 - *MutS Homolog 6*, PMS2 - *Postmeiotic Segregation increased 2*) EPCAM - *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (codifica uma proteína que regula MSH2) causam instabilidade em regiões de microssatélites. Microssatélites de DNA são sequências repetidas de nucleotídeos no genoma em que a falha na sequência ocasiona eventos mutacionais (Gian *et al.*, 2018; Nguyen; Goel; Chung, 2020).

A outra via de lesão precursora do CCR é a via serrilhada e está frequentemente associada a mutações KRAS e BRAF e à instabilidade epigenética, caracterizada pelo fenótipo de metilação da ilha CpG (CIMP, do inglês *CpG island methylator phenotype*) que é considerado o mecanismo principal que leva a via serrilha em direção ao CCR. Além disso, o CIMP está associado a cânceres estáveis e instáveis de microssatélites (Brenner; Kloor; Pox, 2014; Dekker *et al.*, 2019).

Com base nessas vias moleculares, o CCR pode ser subclassificado em quatro subtipos moleculares de consenso (CMS, do inglês, *consensus molecular subtypes*): CMS1 (MSI - imune) associado a hipermutação e hipermetilação e forte ativação imune, CMS2 (canônico), epitelial, cromossomicamente instável, marcada ativação da sinalização WNT e MYC, CMS3 (metabólico) epitelial, evidente desregulação metabólica e CMS4 (mesenquimal) que ativa o fator de crescimento transformador β (TGF β) de um microambiente inflamado enriquecido com estroma e funciona como um importante impulsor na transição epitelial-mesenquimal (EMT). Acredita-se que uma mudança da carcinogênese canônica CMS2 para CMS3 ocorra precocemente, com uma combinação única de mutações KRAS e eventos de número de cópias causando desregulação metabólica como característica dominante no nível de expressão gênica (Dienstmann *et al.*, 2017; Müller; Ibrahim; Arends, 2016).

É importante ressaltar ainda que as frequências dessas características moleculares variam dependendo da localização do tumor no intestino. O cólon do lado direito (ceco, cólon ascendente, flexura hepática) são diferentes comparadas ao cólon esquerdo (flexura esplênica, cólon descendente, sigmóide, retossigmóide) e reto. Sabe-se ainda que há uma maior incidência de instabilidade de microssatélites (MSI), associado com o fenótipo de hipermetilação da ilha

CpG (CIMP-H) e o subtipo de consenso molecular 1 (CMS1) em tumores do lado direito. Tais características estão individualmente associadas ao prognóstico do paciente e a melhor resposta ao tratamento (ABE *et al.*, 2022; TRAN *et al.*, 2011; CHA *et al.*, 2016; GUINNEY *et al.*, 2015).

2.4 Metilação de DNA em ilhas CpG

A metilação do DNA refere-se à adição enzimática de um grupo metil (CH_3) à posição 5 da citosina pela ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT), resultando na produção de 5-metilcitosina, um componente natural do DNA. A metilação de DNA é um mecanismo normal no genoma dos mamíferos pelo qual as células regulam a expressão gênica. No entanto, em regiões chamadas de ilhas CpG, são geralmente não metiladas (Issa, 2004; Reik; Lewis, 2005)

As ilhas CpG são regiões no genoma onde a porcentagem de dinucleotídeos CpG são maiores do que seria esperado com base em uma distribuição aleatória de nucleotídeos. Essas ilhas são frequentemente definidas como sequências com mais de 200-500 bases de comprimento com conteúdo de CG (citosina-guanina) superior a 50%. As ilhas CpG sobrepõem-se à região promotora de 60 – 70% dos genes e tendem a ser protegidas da metilação. No entanto, quando ocorre metilação aberrante nas ilhas CpG, dentro da região promotora, isto está correlacionado com o silenciamento transcricional desses genes (Gardiner-Garden; Frommer, 1987; Lao; Grady, 2011).

Como a metilação representa um mecanismo molecular associado a repressão gênica, alterações anormais de metilação podem contribuir para o fenótipo tumoral inibindo genes inicialmente ativos no tecido de origem, principalmente naqueles envolvidos na supressão tumoral (Klutstein *et al.*, 2016).

O perfil de metilação do DNA dos tecidos cancerosos é diferente em comparação aos tecidos normais, e as alterações que ocorrem vão depender de cada tipo de câncer. A metilação nas ilhas CpG, a chamada hipermetilação, ocorre tipicamente em genes supressores tumorais e suprime suas funções (figura 3). Em relação ao CCR, o fenótipo específico de metilação em ilhas CpG (CIMP), é caracterizado pela hipermetilação dos genes envolvidos no controle do crescimento e sobrevivência celular, e isto está associado a várias características moleculares e clínico patológicas do CCR (Maugeri *et al.*, 2020; Pérez *et al.*, 2018).

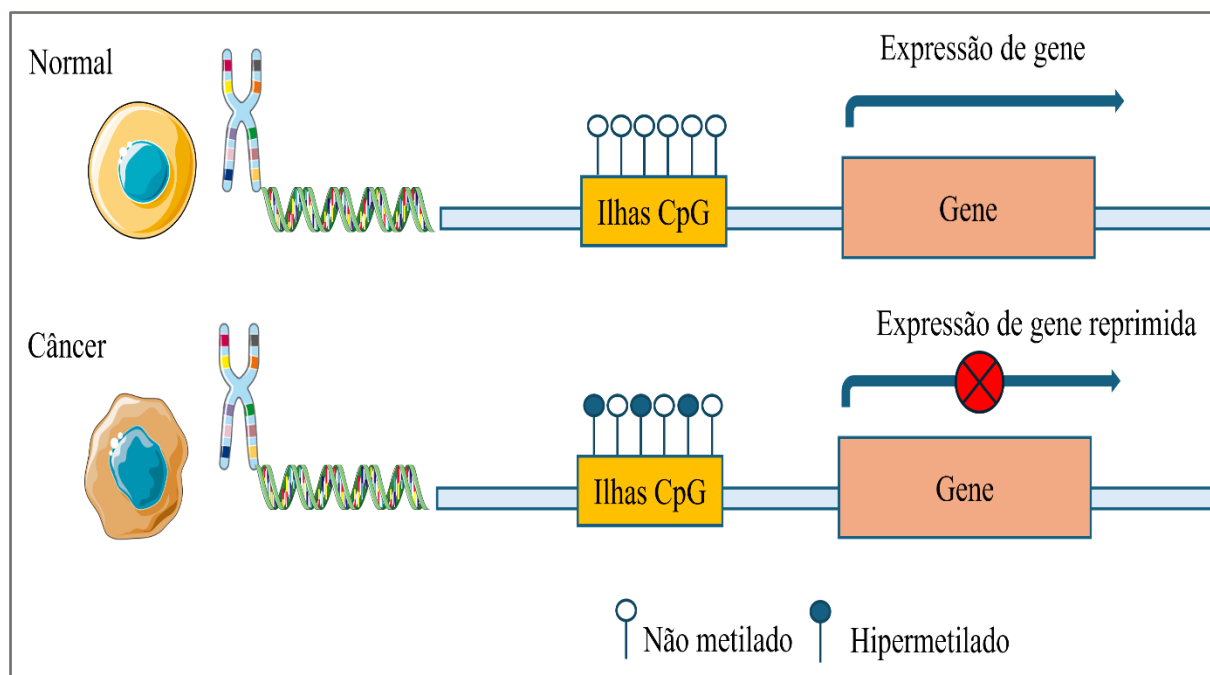


Figura 3. Diferenças de metilação de DNA da ilha CpG em célula normal e cancerosa. As hastes abertas representam sítios CpG não metilados, enquanto as hastes fechadas representam ilhas CpG hipermetiladas em regiões promotoras de genes, provocando o silenciamento transcricional. **Fonte:** Elaborado pela autora.

O fenótipo de metilação da ilha CpG (CIMP) foi descrito inicialmente por Toyota *et al.*, 1999 e pode ser classificado em baixo (CIMP-L), alto (CIMP-H), ou negativo (CIMP-0) de acordo com o grau de hipermetilações simultâneas que ocorrem nas ilhas CpG localizadas próximas às regiões dos genes supressores de tumor (Toyota *et al.*, 1999; Ogino, 2006; Advani *et al.*, 2019).

Atualmente, estes fenótipos têm sido alvo de estudos para a definição de marcadores preditores de prognóstico ou mesmo de predição de risco para lesões pré-malignas de regiões do CCR. Jia *et al.* 2016, em seu estudo demonstraram uma prevalência estimada do fenótipo CIMP-H em tumores de CCR que variou entre 7 e 48% dos casos. Em revisão sistemática realizada por Advani *et al.* 2019, demonstrou a prevalência de CIMP-H no Brasil de 25% dos casos (Jia *et al.*, 2016; Advani *et al.*, 2019).

A caracterização do CIMP é feita pelo uso de painéis de pesquisa de metilação em grupos gênicos já descritos na literatura e que são comprometidos no desenvolvimento do CCR, como genes: *CDKN2A* (do inglês, *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), *CDO1* (do inglês *cysteine dioxygenase type 1*), *CRABP1* (do inglês, *cellular retinoic acid binding protein 1*), *IGF2* (do inglês *insulin like growth factor 2*), *MLH1* (do inglês *mutL homolog 1*), *NEUROG1*

(do inglês, *neurogenin 1*), *RUNX3* (do inglês, *RUNX family transcription factor 3*), *SOCS1* (do inglês, *suppressor of cytokine signaling 1*) (OGINO *et al.*, 2006; WEISENBERGER *et al.*, 2006; BRAIT *et al.*, 2012).

O gene *CDKN2A* (gene que codifica o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A), localizado no cromossomo 9p21.3. A proteína é responsável por produzir proteínas que atuam como inibidoras de quinase dependente de ciclina, que ajudam a controlar o ciclo celular, impedindo que as células se dividam e cresçam de forma descontrolada. A hipermetilação deste gene é descrita em 12-51% dos cânceres colorretais e é frequentemente incluída no painel de marcadores usados para avaliar o fenótipo CIMP (Shima *et al.*, 2011).

O *CDO1* (o gene que codifica cisteína dioxigenase tipo 1) é localizado no cromossomo 5q22,3, codifica uma metaloenzima não-heme, contendo ferro, envolvida na conversão de cisteína em sulfinato de cisteína que por sua vez suprime o efluxo de hidrogênio das mitocôndrias para os compartimentos intracelulares e induz a manutenção do potencial mitocondrial (Kojima *et al.*, 2018). Um estudo de BRAIT *et al.*, 2012, demonstrou que este gene *CDO1* possui alta frequência de metilação em tecidos primários de CCR quando comparado aos tecidos normais. Além disso, é sugerido como um gene supressor de tumor e um marcador molecular potencialmente valioso para o diagnóstico e caracterização molecular do câncer humano.

O *CRABP1* (gene que codifica a proteína ligadora do ácido retinóico celular 1), localizado no cromossomo 15q25.1, codifica a proteína que desempenha um papel importante nos processos de diferenciação e proliferação mediados pelo ácido retinóico. Este gene, demonstrou ser inativado pela hipermetilação em CCR (Ogino *et al.*, 2006). Um estudo de (Lind *et al.*, 2006), também demonstrou que a metilação de *CRABP1* em linhagens celulares de câncer de cólon estava presente tanto em tumores benignos, quanto malignos do intestino grosso, em contraste com a mucosa normal, mostrando que essa alteração é um evento precoce da tumorigênese. Além de apresentar expressão gênica reduzida ou inexistente.

O *IGF2* (gene que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina 2), localizado no cromossomo 11p15.5, codifica proteína envolvida na proliferação celular, crescimento, migração, diferenciação e sobrevivência celular. O IGF2 tem um efeito promotor de tumor na neoplasia colorretal e o status de metilação deste gene pode estar associado a um risco no desenvolvimento e prognóstico do CCR (Bergman *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2023).

A metilação nas ilhas CpG do gene de reparo *MLH1* (mutL homolog 1), corresponde a aproximadamente 18,7% dos casos de CCR esporádico com alta instabilidade de microsatélites (Li, X. *et al.*, 2013) O *MLH1* é um gene de reparo MMR (reparo de

incompatibilidade) do DNA, localizado no cromossomo 3p22.2, e que codifica uma proteína que tem como função a correção dos erros de inserção e deleção durante a replicação do DNA (Silva *et al.*, 2009).

O *NEUROG1* (gene que codifica a neurogenina 1) é um gene localizado no cromossomo 5q31.1 e codifica a proteína que atua como regulador transcricional. A análise de metilação de *NEUROG1* em tumores de CCR mostrou hipermetilação progressiva associada ao desenvolvimento neoplásico desde a mucosa normal, pólipos hiperplásicos, adenoma, carcinoma primário e por fim carcinoma metastático, no qual verificou-se maior metilação (Ibrahim *et al.*, 2011). Em estudo de coorte, foi analisado a metilação de *NEUROG1* no soro de pacientes saudáveis e com CCR e verificou-se que a metilação deste gene é frequentemente encontrada no soro de pacientes com CCR, sugerindo sua utilidade para o diagnóstico de CCR (Otero-Estévez *et al.*, 2020).

O gene *RUNX3* (gene que codifica o fator de transcrição 3 da família RUNX), localizado no cromossomo 1p36.11, que codifica para proteína, funciona como supressor tumoral e é frequentemente excluído ou silenciado no câncer. A hipermetilação deste gene foi encontrada em 39% dos tumores colorretais ressecados cirurgicamente (Nishio *et al.*, 2010). Um estudo de Shin *et al.*, 2018 apresentou 32,3% de hipermetilação deste gene em amostras de tecido de CCR, sendo associado a invasão vascular e linfática e a piores desfechos clínicos e baixa sobrevida.

O *SOCS1* (gene que codifica o supressor da sinalização de citocinas 1), localizado no cromossomo 16p13.13, codifica proteínas moduladoras da sinalização de citocinas e fatores de crescimento e importante para a proliferação e sobrevivência celular (Endo *et al.*, 1997). Em estudo, Kang *et al.*, 2016 demonstraram 44% de hipermetilação em amostras de tecidos de CCR e em contrapartida, apenas 12% em amostras de tecidos saudáveis. Notaram ainda que a hipermetilação deste gene poderia ser responsável por agravar o desenvolvimento e estar relacionado a progressão e metástase do CCR.

2.5 PCR em tempo real para análise de metilação no câncer colorretal

Para analisar o perfil de metilação do DNA em regiões específicas do gene, pode-se utilizar o método *MethyLight* ou qMSP (*Quantitative Methylation Specific - Polymerase Chain Reaction*), descrito por Eads *et al.*, (2000). Neste método, o DNA tratado com bissulfito de sódio é amplificado por PCR em tempo real na presença de uma sonda fluorescente juntamente com primers específicos para a região metilada. É uma técnica altamente sensível, específica e

reprodutível com capacidade de detectar frequências muito baixas de metilação (Eads *et al.*, 2000).

LI, Hui *et al.*, 2019 avaliaram o desempenho do ensaio qMSP para detecção de DNA SFRP2 (*Secreted Frizzled-Related Protein 2*) metilado em tecido e soro de pacientes com CCR, verificou-se que o nível de metilação SFRP2 foi maior em 94,1% nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos paracancerosos adjacentes, bem como mostrou-se sensível e específico na identificação de metilação do SFRP2 no soro (69,4%) de pacientes com CCR. Em outro estudo, foi utilizado ensaio multiplex *MethyLight* para identificação de metilação de HOXA9 (*Homeobox A9*) e HIC1 (*Hypermethylated in In Cancer 1*) no DNA sérico de pacientes com câncer de ovário, este ensaio combinado a esses marcadores mostrou sensibilidade de 88,9% (Singh *et al.*, 2020). Além disso esta técnica também pode ser utilizada em FFPE (*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*) (Olkhov-Mitsel *et al.*, 2012) e sedimentos urinários (Reinert *et al.*, 2012).

Sendo assim, este método possui grandes vantagens. Primeiro, devido a sua simplicidade, especificidade e sensibilidade. Segundo, pode-se utilizar pequenas quantidades de molde de DNA, tornando o método compatível com amostras de plasma e pequenas biópsias. Terceiro, tem a capacidade potencial de ser usada como uma ferramenta de triagem rápida e excepcionalmente adequada para a detecção de biomarcadores de metilação de DNA de baixa frequência (Campan *et al.*, 2009; Liu Yu; Liao Jieyue; Lu Qianjin, 2015). No entanto, ressaltasse que a acurácia deste método ainda é dependente da conversão completa do DNA em bissulfito (Wang; Wu, 2018).

2.6 Inflamação no câncer colorretal

A inflamação está presente nas diferentes etapas da carcinogênese e da progressão da maioria das neoplasias malignas (Greten; Grivennikov, 2019). A inflamação associada ao câncer, assume mecanismos diversos dependendo do tempo e frequência de estímulos recebidos (Schmitt; Greten, 2021).

As respostas inflamatórias “normais” são diferentes da inflamação no câncer. Em uma resposta inflamatória “normal”, quando há insultos (estresses, dano tecidual, infecção, alterações metabólicas e outras alterações na homeostase) aos tecidos epiteliais, a inflamação é ativada para restaurar a homeostase e prevenir a perda da função tecidual. Através da ativação de células mieloides (macrófagos, monócitos e células dendríticas) que podem aumentar seu número por proliferação local dependendo do estímulo recebido e assim produzir citocinas

inflamatórias para ativar a imunidade inata e adaptativa para se livrar do agente perturbador e restabelecer a homeostase. No entanto, na inflamação causada por um evento oncogênico, a imunidade esterilizante não removerá o insulto inicial e a inflamação aumentada e a proliferação impulsionada por citocinas irão facilitar o crescimento do tumor ao invés de restaurar a homeostase epitelial normal (figura 4) (Greten; Grivennikov, 2019).

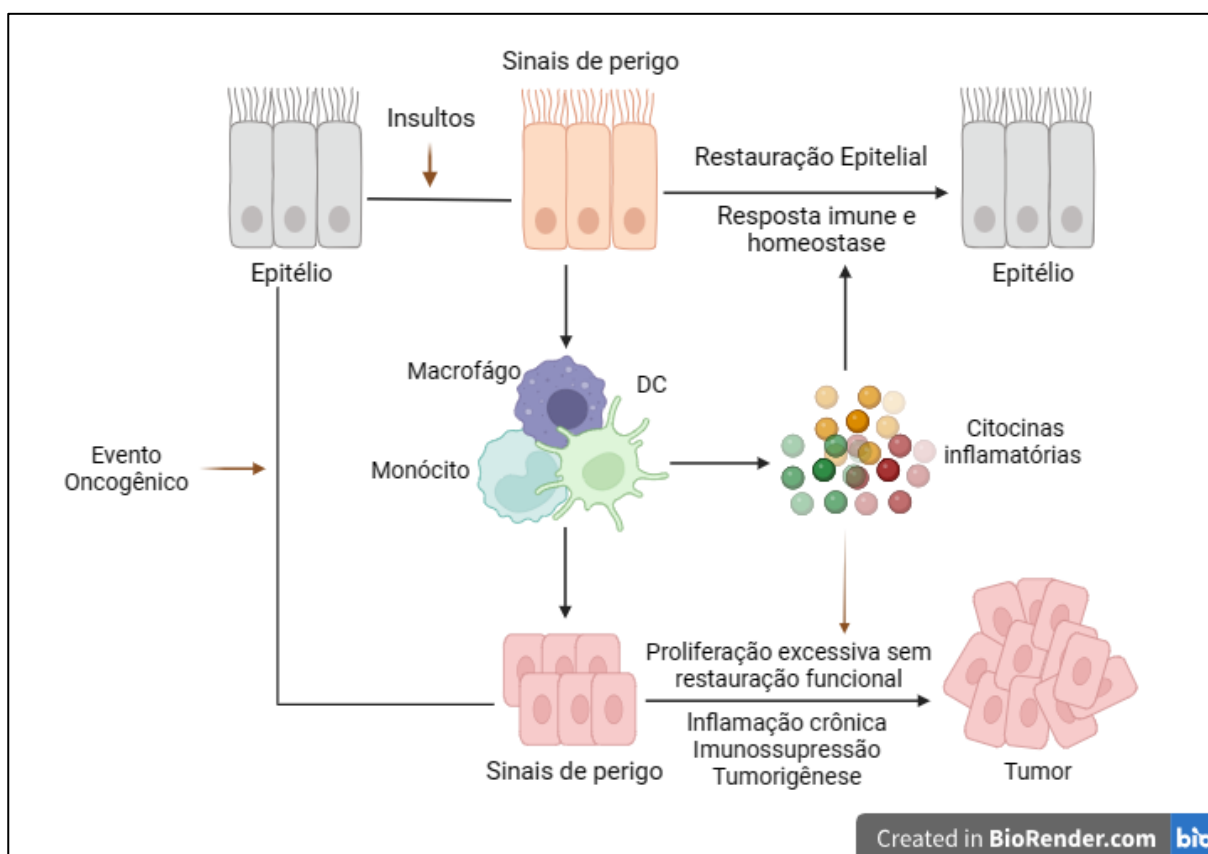


Figura 4. Diferenças evolutivas e funcionais entre inflamação durante uma infecção com regeneração tecidual e inflamação no câncer impulsionada por proliferação excessiva de citocinas inflamatórias que facilitam o crescimento do tumor. Fonte: Adaptado de (Greten; Grivennikov, 2019).

No contexto do CCR, as formas em que a inflamação pode estar envolvida na patogênese deste câncer podem ser distinguidas em inflamação crônica que precede a tumorigênese e é desencadeada por infecções, autoimunidade ou fatores ambientais que podem iniciar ou promover a tumorigênese através de danos ao DNA. A inflamação induzida pelo tumor, no qual a progressão do tumor inicia uma resposta inflamatória que é frequentemente pró-tumorigênica devido à morte celular por hipóxia ou à quebra da barreira epitelial e ao subsequente influxo de produtos microbianos. Por fim, a inflamação induzida pela terapia que é capaz de desencadear inflamação promotora de tumor devido à liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) de células necróticas. Sobre tudo, todos eles têm em

comum a ativação de células imunes inatas que promovem tumores e o estabelecimento de um microambiente tumoral imunossupressor (Schmitt; Greten, 2021).

De modo geral, a tumorigênese colorretal requer um evento iniciador do tumor que transforma as células epiteliais intestinais normais (IECs) por mutação espontânea, mutagênicos ambientais ou alterações epigenéticas ou genéticas induzidas por inflamação. A expansão clonal dessas células “iniciadas”, impulsionada por mutações que causam hiperproliferação, como de APC ou outros genes que codificam componentes de sinalização da via WNT (do inglês, Wingless/Integrated-1), mutações adicionais, como de KRAS, TP53 ou TGFBR2, e fatores estimuladores de crescimento do microambiente tumoral (MAT), levam ao crescimento desses clones em tumores malignos, o que é conhecido como promoção tumoral. Outras mutações e alterações permitem que esses tumores posteriormente metastatizem para órgãos distantes. O tecido tumoral epitelial está constantemente em interação com as células do MAT através dos efeitos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Sendo assim, um ambiente inflamatório não só contribui para o início do tumor, por exemplo, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou alterações epigenéticas, mas também promove a tumorigênese, fornecendo fatores de crescimento e produção de citocinas e quimiocinas que impulsionam a progressão do tumor (Schmitt; Greten, 2021).

Nesse contexto, a inflamação é reconhecida como um dos marcos fundamentais do câncer (*Hallmarks of Cancer*), conforme proposto por Hanahan e Weinberg (2011, 2022). Os autores descrevem que a inflamação no microambiente tumoral contribui diretamente para várias características essenciais à manutenção e progressão do câncer, como a sustentação de sinais proliferativos, evasão da morte celular, indução de angiogênese e ativação da invasão e metástase. Dessa forma, a inflamação não é apenas uma consequência, mas um componente ativo e sustentador do processo tumorigênico, integrando-se aos demais *hallmarks* que caracterizam o câncer colorretal e reforçam sua relevância como alvo terapêutico e biomarcador prognóstico.

2.7 O papel das citocinas no câncer colorretal

Os tumores colorretais precoces e avançados diferem em estrutura e apresentam níveis séricos alterados de citocinas. As citocinas são um grupo de proteínas heterogêneas de alta atividade biológica que controlam e regulam as funções celulares. A superexpressão de citocinas e seus receptores acompanha o desenvolvimento e progressão do tumor, e seu

importante papel na patogênese do câncer está sendo cada vez mais reconhecido (Kaminska *et al.*, 2005).

Dentre as citocinas associadas ao CCR, pode-se citar: Interleucina-1 β (IL-1 β), membro da família IL-1, é produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CDs) e células-tronco mutantes, desempenhando um papel crucial na produção de IL-17 pelo perfil Th17 em murinos e humanos (Dmitrieva-Posocco *et al.*, 2019). Esta citocina possui ações pró-tumorais e antitumorais. Dentre as ações pró-tumorais, a IL-1 β promove o recrutamento de células MDSC (do inglês, *Myeloid-derived suppressor cells*) imunossupressoras para tumores, o que favorece a progressão do câncer (Bunt *et al.*, 2006, 2007). Além disso, estimulam as células epiteliais intestinais e tumorais a induzir sua proliferação. Além de induzir a ativação da via de sinalização WNT pela fosforilação da GSK3 β . Sabe-se que essas vias de sinalização desempenham um papel fundamental na tumorigênese intestinal (Kaler; Augenlicht; Klampfer, 2009). Suas atividades antitumorais também foram relatadas. A IL-1 β fortaleceu a resposta antigênica em células T CD4 e CD8, induzindo expansão e ativação de células Th1, Th2 e Th17 em camundongos (Yakov Krelin *et al.*, 2007). Estudos apontam ainda que nos estágios iniciais da carcinogênese, a IL-1 β , exibiu atividade pró-inflamatória, promotora de invasão tumoral e imunossupressora (Zhang; Borchering; Kolb, 2020; Apte; Voronov, 2017). Czajka-Francuz e colaboradores (2021) propõem que os macrófagos M2 sejam uma importante fonte de IL-1 β em pacientes com CCR, pois consistem em até metade da massa tumoral em estádios avançados. Sobretudo, mais estudos são necessários para esclarecer o papel da IL-1 β no CCR.

As principais fontes da Interleucina-2 (IL-2) são T CD4 + ativadas, células T CD8 + ativadas e células dendríticas (Liao; Lin; Leonard, 2011). É uma importante citocina antitumoral e desempenha um papel fundamental na imunidade mediada por células (Malek; Castro, 2010). Suas concentrações encontram-se reduzidas na progressão da doença, tanto em estágio iniciais quanto metastáticos, o que indica a prevalência de processos pró tumorais em pacientes com CCR (Lippitz, 2013; Johdi *et al.*, 2017).

A Interleucina-4 (IL-4) é produzida por vários tipos de células, incluindo mastócitos, basófilos e linfócitos T ativados. É uma citocina Th2 conhecida principalmente por controlar as funções dos linfócitos B e T (Koller *et al.*, 2010). Possui funções pró e antitumorais, dependendo do ambiente tumoral (Czajka-Francuz *et al.*, 2021). Seus níveis aumentados estão associados a proliferação de células tumorais, invasão e metástase no CCR (Koller *et al.*, 2010; Kantola *et al.*, 2012).

A Interleucina-6 (IL-6) é produzida por diversos tipos de células como monócitos, macrófagos, células de Kupffer. Possui atividade anti e pró-inflamatória e seu papel predominante no câncer é a promoção do crescimento tumoral (Chonov *et al.*, 2019). Esta citocina contribui para a aceleração da progressão tumoral e aumento de migração de células no CCR, bem como os seus níveis aumentados estão associados ao mau prognóstico em pacientes com CCR (Kasprzak, 2021; Xu *et al.*, 2016).

A Interleucina-8 (IL-8), é secretada principalmente por macrófagos M2 e monócitos, mas também pode ser produzida por células endoteliais e sob exposição a IL-1 ou TNF-alfa (Czajka-Francuz *et al.*, 2021). A IL-8 é um dos principais fatores que contribuem para o crescimento tumoral. Promove ainda a angiogênese, proliferação, invasão, migração e sobrevivência das células do CCR. Níveis elevados de IL-8 foram associados com aumento da infiltração de neutrófilos em tumores e respostas ruins ao bloqueio do ponto de verificação imunológico (Schalper *et al.*, 2020). Por outro lado, um nível elevado desta citocina antes do tratamento correlacionou-se com a doença progressiva do CCR (Pączek *et al.*, 2020a).

A Interleucina-10 (IL-10), é produzida principalmente por macrófagos M2 e células Th2, mas também por monócitos, mastócitos, células Treg e por subgrupos de células T e B ativadas. É uma importante citocina reguladora com potente efeito anti-inflamatório (Gonzalez-Garza *et al.*, 2020). Inibe a síntese das citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) por monócitos/macrófagos estimulados (Varma *et al.*, 2001). No CCR, os níveis séricos aumentados desta citocina ao longo do tempo estão associados a progressão do câncer. Além de ser correlacionada ao mau prognóstico e a recidiva de pacientes com CCR (O'Hara *et al.*, 1998; Miteva *et al.*, 2014; Li, B. *et al.*, 2019).

A Interleucina-12 (IL-12p70), é uma citocina que exibe notáveis propriedades antitumorais que são mediadas principalmente pela secreção de interferon (IFN)- γ por células T CD4+, CD8+, natural killer (NK) ou células NK-T (Engel; Neurath, 2010). É constituída por duas subunidades, IL-12p35 e IL-12p40; essas subunidades podem formar um heterodímero agonístico IL-12p70 ou um homodímero IL-12p80 antagônico (Gillesen *et al.*, 1995). Os níveis aumentados de IL-12P7 no plasma de pacientes com CCR está correlacionado ao avanço da doença (Zheng *et al.*, 2022a).

A Interleucina-17 (IL-17A) é produzida principalmente por Th17, mas também pode ser produzida por linfócitos Tgamma delta, células NKT, neutrófilos e eosinófilos (Song; Qian, 2013). Tem ação pró-tumoral e o aumento dos seus níveis estão associados ao aumento da produção de VEGF e mau prognóstico do CCR (Jiankun Liu *et al.*, 2011). Na maioria dos

estudos, a concentração de IL-17A foi encontrada elevada em todos os estágios, sendo seus níveis mais altos em estágio III e IV (Czajka-Francuz *et al.*, 2021).

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) é secretado principalmente por monócitos e macrófagos ativados. Possui uma presença singular na patogênese da maioria das doenças inflamatórias e está associado a um baixo prognóstico e avanço dos danos celulares, bem como a perda de função, queda da produção hormonal e da homeostasia (Huang *et al.*, 2019). Estudos sugerem que o TNF desempenha o papel pró-tumoral no desenvolvimento do CCR. Verificou-se que a expressão de TNF está aumentado nos tecidos do CCR e que os níveis séricos de TNF correlacionam-se com a progressão do CCR e a redução da sobrevida dos pacientes (Al Obeed *et al.*, 2014). Ademais, o TNF- α ativa a sinalização NF-kB (fator nuclear Kappa B), contribuindo assim para a inflamação, sobrevivência celular, proliferação, no qual o fator de transcrição NF-kB liga a sinalização inflamatória e câncer. O NF-kB promove metástase tumoral por regular a transição epitélio-mesenquimal no CCR (Kobelt *et al.*, 2020).

O IFN- γ é produzido por células NK e NKT, bem como por células CD4 Th1 e linfócitos T citotóxicos CD8 (CTL) após sua ativação (Schoenborn; Wilson, 2007). Esta citocina estimula a imunidade antitumoral (Dunn; Koebel; Schreiber, 2006). A sinalização de IFN-gama é um fator chave para a polarização das respostas imunes Th1. A polarização da resposta Th1 aumentada pelo IFN-gama se correlaciona com a sobrevida prolongada de pacientes com CCR (Tosolini *et al.*, 2011). Dados sugerem que o IFN-gama induz uma resposta protetora e antitumoral em pacientes com CCR. No entanto, também foi demonstrado que o IFN-gama pode aumentar a permeabilidade intestinal, o que pode aumentar a inflamação intestinal e estimular a formação de CRC (Grivennikov *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Descrever a frequência e caracterizar os fenótipos de metilação tecidual e perfil de citocinas séricas em pacientes com câncer colorretal no estado do Amazonas.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o perfil sociodemográfico, epidemiológico, clínico, patológico e estilo de vida dos pacientes com câncer de colorretal;
- b) Analisar o padrão de fenótipos de metilação de genes relacionados com hipermetilação em tecido tumoral e o tecido não tumoral adjacente;
- c) Avaliar as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CXCL-8, IL12p70, IL-17A e TNF- α , IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-10) dos pacientes com câncer colorretal;
- d) Correlacionar o perfil de citocinas séricas com o padrão de fenótipos de metilação e características clínicas e patológicas dos pacientes com câncer colorretal.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e analítico, desenvolvido e relatado conforme as recomendações do STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) (Vandenbroucke *et al.*, 2007).

Este estudo faz parte de um estudo maior, intitulado “Análise do espectro molecular e clínico do câncer colorretal: da epidemiologia e qualidade de vida à genética e análises ômicas” (estudo EMCOR).

O mesmo, foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON sob o número de CAEE 52343821.2.0000.0004 e número de parecer 5.180.654 e atende a Resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012 (Anexo 10.2). As amostras coletadas foram armazenadas em biorrepositório no laboratório de biologia molecular da FCECON.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas - FCECON, instituição de referência em oncologia do estado do Amazonas e do norte do país.

A etapa de citometria de fluxo para dosagens de citocinas, foi desenvolvida em parceria com o grupo de pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

4.3 População do estudo

A população do estudo foi constituída de pacientes com diagnóstico confirmado de CCR, procedentes dos Estados da Amazônia Legal, que procuraram atendimento na FCECON no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024.

4.4 Amostragem

Levou-se em consideração a média de novos casos diagnosticados com adenocarcinoma colorretal na FCECON (95 casos por ano de acordo com rotina da instituição), que 50% dos

casos são encaminhados para o tratamento cirúrgico como primeira escolha. Além disso, considerando-se uma perda estimada de mais 50% (por dificuldade de coleta pareada de tecido tumoral, tecido normal adjacente – dependentes do cirurgião - e plasma), o N amostral estimado para um período de dois anos foi de 48 participantes, recrutados por demanda espontânea. De cada paciente foram analisadas duas amostras teciduais (tecido tumoral e tecido não tumoral adjacente) e uma amostra sérica.

4.5 Critérios de elegibilidade

4.5.1 Critérios de inclusão

- Pacientes de ambos os sexos com idade igual ou superior a 18 anos;
- Com diagnóstico confirmado de adenocarcinoma de colorretal (CID-10 = C18, C19, C20);
- Sem tratamento prévio de radioterapia e quimioterapia
- Pacientes que são submetidos a colectomia parcial ou total, retossigmoidectomia, ou biopsia por endoscopia realizada no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024;
- Que tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.5.2 Critérios de exclusão

- Participantes com amostras insuficientes para realização das análises;
- Aqueles com informações incompletas no prontuário e que não apresentaram dados suficientes para caracterização clínica da doença.

4.6 Coleta de amostras e análises laboratoriais

4.6.1 Abordagem aos pacientes

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram abordados durante a consulta ambulatorial de rotina no serviço de cirurgia oncológica (antes do procedimento cirúrgico), ou no serviço de endoscopia da FCECON. A abordagem foi realizada em sala reservada localizada no ambulatório ou no serviço de endoscopia, realizando a entrevista e explanação sobre a pesquisa, sendo orientados sobre o estudo e seus objetivos, bem como, convidados a participar do mesmo. Ao concordarem com os termos do estudo, foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo 10.3) e através de um questionário padrão, foram coletadas informações sociodemográficas sobre os fatores de risco e os determinantes de saúde (estilo de vida) relacionados ao câncer de Colorretal (Anexo 10.4).

Quadro 2. Variáveis analisadas no estudo

1	Gênero
2	Idade
3	Raça
4	Município de Nascimento
5	IMC (Parâmetros: < 22 Baixo peso; 22 a 27 Normal; > 27 Sobrepeso)
6	Fatores de risco (prática de esporte, tabagismo, consumo de álcool, consumo de comidas industrializadas, carne vermelha processada e carne salgada)
7	Sintomatologia
8	Localização do tumor
9	Tipo de lesão
10	Histologia do tumor primário e tipo histológico (tipo de célula que originou o tumor)
11	Estadiamento clínico
12	Tratamento instituído
13	Histórico de doenças (infecções, doenças crônicas)
14	Histórico familiar de câncer

4.6.2 Coleta do sangue periférico e obtenção de plasma

Foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubo contendo EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*) para separação do plasma (tubo PPT: *Plasm preparations tube*) de acordo com a rotina dos exames pré-operatórios no Laboratório de Análises Clínicas da FCECON. A amostra foi centrifugada e após separação do plasma foi armazenado em freezer a -80°C até a análise na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), com o qual o grupo de pesquisa mantém parceria.

4.6.3 Coleta de peça cirúrgica ou biópsia

A coleta das amostras de tecido tumoral e do tecido não tumoral adjacente foi realizada em casos submetidos à cirurgia ou biópsia incisional. Em todos os casos, a coleta do tecido foi realizada por equipe médica responsável pela assistência ao paciente e colaboradora do estudo.

Em casos cirúrgicos foram retirados cinco fragmentos da lesão tumoral de 3-5mm do tecido tumoral e não tumoral adjacente. Em casos de biópsia foram retirados três fragmentos da lesão tumoral de 3-5mm e um não tumoral adjacente.

O material coletado foi então pesado (40 – 60 mg) e armazenado imediatamente em microtubos de 1,5 mL livres de DNase e RNase e congelados a -80°C até o momento de início das análises moleculares.

4.6.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de tecido tumoral e não tumoral adjacente (provenientes de ressecções cirúrgicas ou biópsias colonoscópicas), utilizando o kit comercial *RealiaPrep™ gDNA Tissue Miniprep* (Promega Corporation, Madison, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Foram utilizados entre 40 e 60 mg de tecido fresco congelado, previamente fragmentado e incubado overnight a 56 °C. O DNA foi eluído em H₂O livre de nucleases, separado em duas alíquotas de 100 µL e armazenado a -20 °C até o uso.

4.6.5 Quantificação de DNA

Todo o DNA extraído foi quantificado, utilizando o Nanodrop™ 2000/2000c *Spectrophotometers* (Thermo Scientific™ São Paulo, Brasil), seguindo os procedimentos operacionais do equipamento e quantificadas no flurímetro Qubit® 4.0 (Thermo Fisher Scientific®), seguindo os procedimentos operacionais do equipamento, a fim de ajustar a concentração e garantir o input ideal de 200-500 ng (em até 45 uL) para a conversão de bissulfito.

As amostras também foram submetidas a corridas em gel de agarose a 0,8% para certificar-se quanto a integridade de DNA das amostras.

4.6.6 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O tratamento de DNA com bissulfito de sódio foi realizado utilizando-se o kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O objetivo do tratamento do DNA com bissulfito de sódio é converter as citosinas não metiladas em uracilas, não alterando as citosinas metiladas.

O procedimento de conversão por bissulfito através do kit EZ DNA Methylation™ foi realizado por três etapas: purificação, desnaturação, conversão com bissulfito de sódio (adicionando reagentes e incubação). O DNA convertido com bissulfito de sódio foi estocado em freezer a -20°C, até posterior análise.

4.6.7 Seleção de genes alvos e os respectivos Primers e Sondas

Os genes foram selecionados após vasta pesquisa bibliográfica de acordo com OGINO *et al.*, 2006 e WEISENBERGER *et al.*, 2006 e BRAIT *et al.*, 2012. Além disso, foi realizada a busca dos genes candidatos em metodologia Array (análise para metiloma, metodologia esta executada pelo grupo de pesquisa) utilizando o total de 52 amostras de pacientes com CCR, sendo 26 controles e 26 tecidos tumoral, classificado em CIMP *high* ou *low*, baseada na média de CpGs presentes nas ilhas dos 8 genes (Anexo 10.1).

Os genes alvos selecionados foram: *CDKN2A*, *CDOI*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOC31*.

Para cada gene foram sintetizados dois pares de primers específicos para as sequências metiladas. A síntese foi realizada pela empresa ThermoFisher, São Paulo, Brasil). Ademais, foi

utilizado o gene da β -actina como calibrador da reação (Eads *et al.*, 2000). As sequências de primers e sondas específicas para metilação de DNA estão apresentadas no quadro 3.

Quadro 3. Sequência de primers e sondas específicos para metilação de DNA.

Gene	Sequências	
β -actin	Primer forward	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
	Primer reverse	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
	Sonda	FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA
CDKN2A	Primer forward	TGGAGTTTTTCGGTTGATTGGTT
	Primer reverse	AACAACGCCCCGCACCTCCT
	Sonda	FAM-ACCCGACCCCGAACCGCG-TAMRA
CDO1	Primer forward	CCACAACGACGAAAATAAAACG
	Primer reverse	TCGGCGTTTTAGGGATCGCG
	Sonda	FAM-TTAACGGCGCGTTTTAGTCGTTCG-TAMRA
CRABP1	Primer forward	TCGAAATTTTCGTTGTTGCGT
	Primer reverse	TATCCGTACCTACCG CCG C
	Sonda	FAM-ACCATACCCAACTTCGCCGACACCTAA-TAMRA
IGF2	Primer forward	GAGCGGTTTCGGTGTCGTTA
	Primer reverse	CCAACTCGATTTAAACCGACG
	Sonda	FAM-CCCTCTACCGTCGCGAACCCGA-TAMRA
MLH1	Primer forward	CTATCGCCGCCTCATCGT
	Primer reverse	CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT
	Sonda	FAM-CGCGACGTCAAACGCCACTACG-TAMRA
NEUROG1	Primer forward	CGT GTAGCGTTCGGGTATTTGTA
	Primer reverse	CGATAATTACGAACACACTCCGAAT
	Sonda	FAM-CGA TAA CGA CCT CCC GCG AAC ATA AA-TAMRA
RUNX3	Primer forward	CGTTCGATGGTGGACGTGT
	Primer reverse	GACGAACAACGTCTTATTACAACGC
	Sonda	FAM-CGCACGAACTCGCCTACGTAATCCG-TAMRA
SOCS1	Primer forward	GCGTCGAGTTCGTGGGTATTT
	Primer reverse	CCGAAACCATCTTCACGCTAA
	Sonda	FAM-ACAATTCCGCTAACGACTATCGCGCA-TAMRA

Foi realizado um teste com todos os primers e sondas específicos para regiões metiladas dos genes alvos, *CDKN2A*, *CDO1*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1* (figura 4). O teste realizado confirmou a eficiência de anelamento dos primers às regiões-alvo de DNA 100% metilado. Por outro lado, não houve amplificação significativa no controle interno com o DNA não metilado, corroborando a ausência de reação cruzada com regiões desprovidas de metilação. Indicando que os primers e sondas utilizados apresentavam

especificidade para regiões metiladas do DNA humano, tornando-os adequados para amostras experimentais.

4.6.8 Análise do padrão de fenótipo de metilação por qPCR

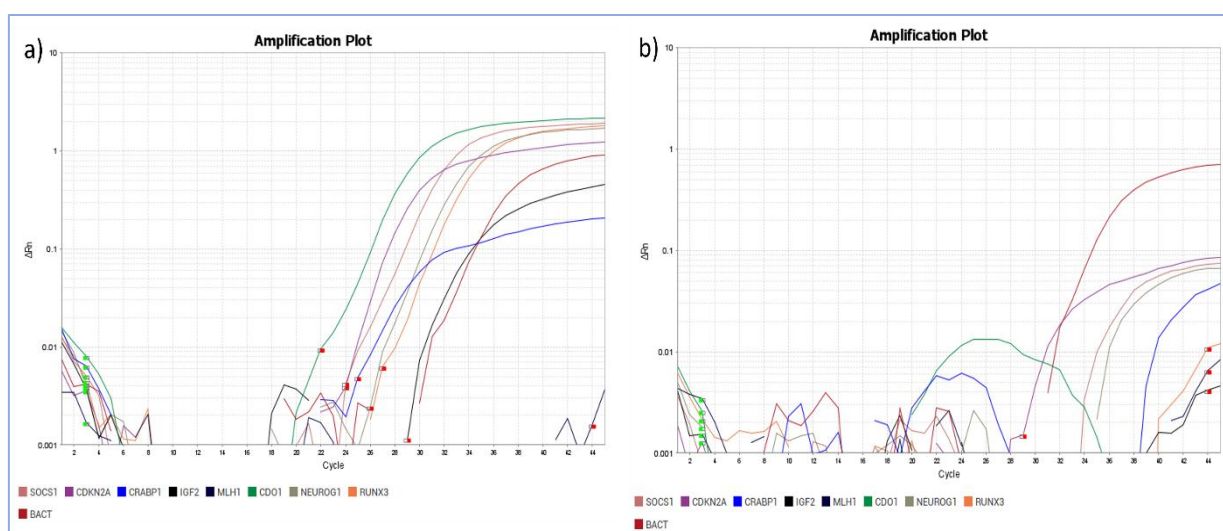


Figura 5. Teste de eficiência de primers e sondas: a) Teste com DNA 100% metilado b) Teste com DNA não metilado.

Os DNAs modificados (convertidos) por bissulfito de sódio foram amplificados pela técnica de metilação quantitativa específica – por reação em cadeia da polimerase. As PCRs foram realizadas no volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de *EpiTect MethyLight Master Mix* (Quiagen, Hilden, Alemanha), 0,6 μ L dos primers *forward/reverse* e volume de DNA 0,2 μ L de sonda, 0,5 μ L de DMSO, 1,1 μ L de H₂O e o volume 2 μ L de DNA tratado com bissulfito de sódio por reação (quadro 4). O ciclo de amplificação foi de 5 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 15s a 95°C e 60s na temperatura de anelamento e extensão de primers à 60°C. Os ensaios foram realizados em duplicata e processados na plataforma QuantStudio™ 5 de PCR em tempo real (Thermo Fisher Scientific© Inc, São Paulo, Brasil) no laboratório de biologia molecular da FCecon.

Quadro 4. Componentes da reação de metilação em qPCR.

Mix (sonda FAM a 100nM)	VOLUME da reação (uL)	Concentração Final (uM)
TaqMan Master Mix 2X	5	1,0
Primer F (10uM)	0,6	0,6
Prime R (10uM)	0,6	0,6
Probe (10uM)	0,2	0,2
DMSO (5%)	0,5	0,5
H ₂ O	1,1	
DNA	2	
Total reação	10	
Total do mix	8	

Para a avaliação do padrão de metilação de DNA em amostras de tecido tumoral e não tumoral, foram avaliados oito genes-alvo (*CDKN2A*, *CDO1*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* e *SOCS1*), incluindo o controle endógeno (β -actina). Para cada gene, foi construída uma curva padrão de calibração a partir de diluições seriadas (1:10) de DNA totalmente metilado com níveis de metilação previamente conhecidos (EpiTect PCR Control DNA, Quiagen, Hilden, Alemanha). Essas curvas foram incluídas em todos os ensaios de qPCR, permitindo a quantificação dos níveis de metilação nas amostras tumorais e não tumorais.

As análises de amplificação e quantificação seguiram as recomendações do MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) Guidelines (Bustin *et al.*, 2009, 2025) com adaptações ao presente estudo. Foram consideradas aceitáveis apenas curvas padrão com coeficiente de determinação (R^2) $\geq 0,98$ e eficiência entre 90 - 110% para aplicação nas amostras experimentais. As duplicatas técnicas das amostras experimentais foram avaliadas quanto à consistência, admitindo-se variação máxima de desvio $\leq 1,2$ entre as duplicatas. Embora valores de Ct acima de 39 geralmente sejam considerados próximos ao limite de detecção, para este estudo optou-se por considerar amostras com amplificação detectável e dentro dos parâmetros estabelecidos pela curva padrão de quantificação. Essa decisão foi adotada para não descartar informações biológicas relevantes, uma vez que o objetivo principal foi a quantificação dos níveis de metilação.

A quantidade de metilação (padrão de metilação) em cada amostra foi calculada pelo método da razão, considerando a média entre quantidade de cópias do gene-alvo metilado em relação à média da quantidade de cópias do gene de referência (β -actina), multiplicado por 100 adaptado de Eads *et al.* (2000). A fórmula aplicada foi: *Metilação* = *Gene alvo* / β -actina $\times 100$. Dessa forma, o resultado revela a porcentagem de metilação do gene de interesse, normalizado

pelo controle interno (β -actina) para minimizar variações na quantidade de DNA utilizado na reação de qPCR.

Inicialmente, o estudo propôs-se a classificar os tumores colorretais em fenótipos com alta metilação (CIMP-H) e baixa metilação (CIMP-L), com base no padrão de metilação de um painel dos genes pré-definidos. A classificação adotaria o critério de CIMP-H para os tumores em que 5 ou mais regiões promotoras de um painel de 8 genes diferentes apresentassem metilação, conforme descrito por Ogino, S et al. (2009). Entretanto, devido às limitações técnicas na obtenção de dados para todos os genes do painel, não foi possível realizar a classificação dos tumores em fenótipos CIMP. Tal limitação foi considerada na análise e discussão dos resultados.

4.6.9 Análise de citocinas séricas

Para a quantificação das concentrações plasmáticas de citocinas, foram utilizados os kits comerciais, Kit BDTM Human Inflammatory Cytokines e do Kit BDTM Human Cytokine Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Diego, CA EUA), seguindo as instruções do fabricante. Esses kits permitiram a dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CXCL-8, IL12p70, IL-17A, TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4 e IL-10). As análises foram realizadas por citometria de fluxo, através do FACSCanto[®] II e processados com o software FCAP-Array v3 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), esta etapa foi realizada no LABGEN 2 da FHEMOAM.

4.6.10 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas e intervalo de confiança ao nível de 95% (IC 95%) para os dados categóricos. Na análise de dados quantitativos, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk que devido a rejeição da hipótese de normalidade optou-se por calcular a mediana e intervalo interquartil. Nas análises de citocinas foram empregados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar dois grupos, e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos. Nenhuma exclusão de outliers foi realizada, visto que a utilização de testes não paramétricos é robusta a valores extremos e não houve justificativa a priori para a exclusão de qualquer ponto de dado. Para as análises de metilação foi usado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Foi aplicado a

transformação logarítmica para normalizar a variação dos dados de metilação, sendo os valores iguais a zero, representados no gráfico como -3 (equivalente a 0,001%). O limiar ideal da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) também foi aplicado para estabelecer um ponto de corte ideal para a metilação a partir dos nossos dados, para a classificação das amostras. Métricas como sensibilidade, especificidade e a Área sob a Curva (AUC) foram geradas para quantificar o desempenho dos genes.

Para avaliar a relação entre a metilação dos genes (*CDKN2A* e *RUNX3*) e as concentrações das citocinas, foram empregadas análises de correlação e regressão. Inicialmente, a correlação de Spearman foi utilizada para investigar a força e a direção da associação entre os níveis de metilação dos genes e as concentrações plasmáticas das citocinas. O coeficiente de correlação de Spearman é uma medida não paramétrica, apropriada para dados que não seguem uma distribuição normal, e foi calculado para todas as combinações de pares de variáveis. Em seguida, foi realizada uma análise de regressão linear múltipla para determinar se as concentrações das citocinas (variáveis independentes) poderiam prever a metilação dos genes e as variáveis clínico-patológicas (variáveis dependentes). O modelo de regressão múltipla permite controlar o efeito de múltiplas variáveis, identificando quais delas têm uma influência independente. Os resultados foram apresentados utilizando os coeficientes beta (β) padronizados, que permitem a comparação da força relativa do efeito de cada variável.

Os softwares utilizados nas análises dos dados foram: Epi Info versão 7.2.6.0, GraphPad Prism versão 8.0.2 e R Studio versão 4.3.2. Em todas as análises, foi adotado um nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$).

5 RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 59 pacientes com diagnóstico histopatológico confirmado de CCR. Dentre estes, 57 apresentavam material biológico de plasma disponível e todos os 59 possuíam amostras de tecido tumoral e não tumoral coletadas. Os dados sociodemográficos, clínicos e patológicos foram analisados de todos os pacientes incluídos. A análise de citocinas foi realizada nas 57 amostras de plasma disponíveis.

Das 59 amostras pareadas de tecido tumoral e não tumoral inicialmente coletadas, 44 foram selecionadas para a análise de metilação, considerando a quantidade e a qualidade do material disponível, bem como a necessidade de otimizar o uso de reagentes diante da análise de oito genes-alvo e do controle endógeno β -actina. Ressalta-se que, devido a perdas técnicas ocorridas durante a etapa de validação, processamento e amplificação, houve redução do número final de pares de amostras efetivamente analisadas para metilação.

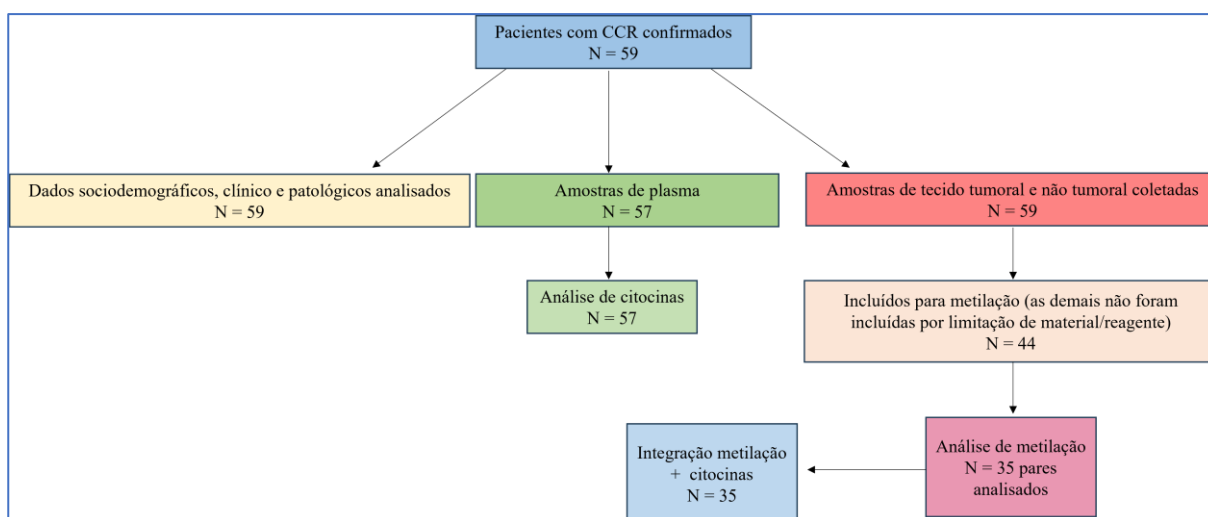


Figura 6. Fluxograma de amostras incluídas no estudo.

5.1 Características sociodemográficas epidemiológicas

As características sociodemográficas e epidemiológicas estão demonstradas na tabela 01. Observa-se que a maioria da população é do gênero feminino (62,7%), com idade média de 62,8 anos (DP=12,0). Quanto a raça, a maioria se declarou parda (67,8%) e natural do estado do Amazonas (62,7%).

Tabela 1. Características sociodemográficas, epidemiológicas dos pacientes com câncer colorretal, atendidos na FCECON no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024 Amazonas, Brasil.

Variáveis (N=59)	% (f)	IC (95%)
Gênero		
Feminino	62,7 (37)	49,2 - 75,0
Masculino	37,3 (22)	25,0 - 50,9
Idade		
18-30	1,2 (1)	0,04 - 9,1
31-50	10,2 (4)	3,8 - 20,8
51-65	44,1 (16)	31,2 - 57,6
>66	44,1 (15)	31,2 - 57,6
Raça		
Branca	22,0 (13)	11,0 - 41,9
Negra	10,2 (6)	3,8 - 20,8
Parda	67,8 (40)	54,4 - 79,4
Estado de Nascimento		
Acre	1,7 (1)	0,07 - 14,5
Amazonas	62,7 (37)	43,5 - 76,9
Ceará	5,1 (3)	1,8 - 22,5
Maranhão	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Mato Grosso	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Mato Grosso do Sul	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Pará	16,9 (10)	4,7 - 29,5
Pernambuco	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Piauí	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Rio Grande do Norte	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Rondônia	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Roraima	1,7 (1)	0,04 - 9,1

f = frequência absoluta simples; IC - intervalo de confiança 95%

5.2 Características de estilo de vida

As características baseadas no estilo de vida dos participantes, estão demonstradas na tabela 02. Dentre as características, 47,5% da população estudada apresentou IMC compatível com sobrepeso no momento do diagnóstico. Quanto a prática de esportes, 69,5% relataram que não praticaram nenhum tipo de esporte ao longo da sua vida. Observou-se ainda que 39,0% e 40,7% relataram já ter fumado e consumido álcool, respectivamente. Além disso, parte significativa da população (61,0%) possuíam hábitos alimentares de comidas industrializados,

64,4% indicavam consumo de carnes vermelhas ou processadas e 50,9% faziam uso de carnes salgadas com frequência semanal.

Tabela 2. Características de estilo de vida dos pacientes com câncer colorretal, atendidos na FCECON, no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024, Amazonas, Brasil.

Variáveis (N=59)	% (f)	IC (95%)
IMC		
Baixo peso	10,2 (6)	3,8 - 20,3
Normal	33,9 (20)	22,1 - 47,4
Obesidade grau I	6,8 (4)	1,9 - 16,5
Obesidade grau III	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Sobrepeso	47,5 (28)	34,3 - 60,9
Prática de esporte		
Não	69,5 (41)	56,1 - 80,8
Sim	30,5 (18)	19,2 - 43,7
Tabagismo		
Não	61,0 (36)	47,4 - 73,5
Sim	39,0 (23)	26,6 - 52,6
Álcool		
Não	59,3 (35)	45,8 - 71,9
Sim	40,7 (24)	28,1 - 54,3
Consumo de industrializados		
Não	39,0 (23)	26,6 - 52,6
Sim	61,0 (36)	47,4 - 73,5
Frequência por Semana		
1 a 7	77,8 (28)	60,9 - 89,9
Mais de 7	16,7 (6)	6,4 - 32,8
Não sabe	5,5 (2)	0,7 - 18,7
Consumo de carne vermelha/processados		
Não	35,6 (21)	23,6 - 49,1
Sim	64,4 (38)	50,9 - 76,5
Frequência por Semana		
1 a 7	86,8 (33)	71,9 - 95,6
Mais de 7	7,9 (3)	1,7 - 21,4
Não sabe	5,3 (2)	0,6 - 17,8
Consumo de carne salgada		
Não	35,6 (21)	23,6 - 49,1

Sim	50,9 (38)	50,9 - 76,5
Frequência por Semana		
1 a 7	76,3 (29)	59,8 - 88,6
Mais de 7	13,1 (5)	4,4 - 28,1
Não sabe	10,5 (4)	2,9 - 24,8
f ⁱ = frequência absoluta simples; IC - intervalo de confiança 95%		

5.3 Características clínicas e patológicas

Em relação a sintomatologia apresentada pelos pacientes diagnosticados com CCR, observou-se que a perda ponderal é um dos sintomas mais comuns entre eles (81,4%), seguido por constipação (57,6%), dor abdominal (52,5) e alteração do hábito intestinal (44,4%) (tabela 3).

Tabela 3. Sintomas relatados pelos pacientes diagnosticados com câncer colorretal, atendidos na FCECON, no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024, Amazonas, Brasil.

Variáveis (N = 59)	% (f ⁱ) Sim	% (f ⁱ) Não	IC (95%) Sim	IC (95%) Não
Sintomas				
Alteração do hábito intestinal	44,1 (26)	55,9 (33)	31,4 - 56,7	43,3 - 68,6
Anemia	40,7 (24)	59,3 (35)	28,1 - 54,3	45,8 - 71,9
Astenia	32,2 (19)	67,8 (40)	20,6 - 45,6	54,4 - 79,4
Constipação	57,6 (34)	42,4 (25)	44,1 - 70,4	29,6 - 55,9
Distensão abdominal	33,9 (20)	66,1 (39)	22,1 - 47,4	52,6 - 77,9
Dor abdominal	52,5 (31)	47,5 (28)	39,1 - 65,7	34,3 - 60,9
Hemorragia intestinal	37,3 (22)	62,7 (37)	25,0 - 49,6	50,4 - 75,0
Febre	20,3 (12)	79,7 (47)	11,0 - 32,8	67,2 - 89,0
Fezes em fita	37,3 (22)	62,7 (37)	25,0 - 50,9	49,2 - 75,0
Massa abdominal palpável	15,3 (9)	84,7 (50)	6,0 - 24,4	75,6 - 93,9
Náuseas e vômitos	35,6 (21)	64,4 (38)	23,5 - 49,1	50,9 - 76,5
Perda Ponderal	81,4 (48)	18,6 (11)	69,1 - 90,39	9,7 - 30,9
Toque retal alterado	15,3 (9)	84,7 (50)	6,0 - 24,4	75,6 - 93,9

fⁱ = frequência absoluta simples; IC - intervalo de confiança 95%

As características clínicas e patológicas são mostradas na tabela 04. O tipo histológico mais diagnosticado foi o Adenocarcinoma que compõem a maioria das malignidades colorretais. Neste estudo prevaleceu o Adenocarcinoma SOE (sem outras especificações) (86,4%). O grau histológico também foi avaliado, sendo 14 (23,7%) com a doença bem diferenciada, 36 (61,0%), com a doença moderadamente diferenciada, 7 (11,9%), pouco

diferenciada e 2 (3,4%) que não puderam ser avaliados quanto ao grau histológico do CCR. A maioria das lesões foi encontrada no retossigmoide (42,4%), com representatividade maior das lesões no lado esquerdo do cólon (78%). Dos 59 pacientes incluídos no estudo 9 (15, 3%) foram classificados no estágio I, 13 (22,0%) no estágio II, 20 (33,9%) no estágio III e 17 (28,8%) no estágio IV da doença. A maioria dos pacientes (71,2%) não apresentou metástase, em contrapartida (28,8%) apresentaram. Durante o período avaliado, 15 pacientes (25,4%) evoluíram para óbito.

Tabela 4. Características clínicas e patológicas dos pacientes diagnosticado com câncer colorretal, atendidos na FCECON, no período de fevereiro de 2022 a dezembro de 2024, Amazonas, Brasil.

Variáveis (N = 59)	% (fi)	IC (95%)
Tipo histológico		
Adenocarcinoma intramucoso	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Adenocarcinoma mucinoso	10,2 (6)	3,8 - 20,8
Adenocarcinoma, SOE	86,4 (51)	73,1 - 92,8
Carcinoma de células em anel de sinete	1,7 (1)	0,04 - 9,1
Grau		
G1, bem diferenciado	23,7 (14)	13,6 - 36,6
G2, moderadamente diferenciado	61,0 (36)	47,4 - 73,5
G3, pouco diferenciado	11,9 (7)	4,9 - 22,9
Gx, não avaliado	3,4 (2)	0,4 - 11,7
Sítio do tumor		
Ceco	8,5 (5)	2,8 - 18,7
Cólon ascendente	11,9 (7)	3,9 - 29,1
Cólon trasverso	16,9 (1)	0,04 - 9,1
Cólon descendente	17,0 (10)	8,4 - 29,0
Retossigmoide	42,4 (25)	29,6 - 55,3
Reto	18,6 (11)	9,7 - 30,9
Lateralidade		
Direito	22,0 (13)	12,3 - 34,7
Esquerdo	78,0 (46)	65,3 - 87,7
Estadiamento		
I	15,3 (9)	7,2 - 27,0
II	22,0 (13)	12,3 - 34,7
III	33,9 (20)	22,1 - 47,4
IV	28,8 (17)	17,8 - 48,1

Metástase		
Não	71,2 (42)	57,9 - 82,2
Sim	28,8 (17)	17,8 - 42,1
Óbito		
Não	74,6 (44)	61,6 - 85,0
Sim	25,4 (15)	15,0 - 38,04

fⁱ = frequência absoluta simples; IC - intervalo de confiança 95%

5.4 Padrão de Metilação de genes alvos em tecido não tumoral e tumoral

Na etapa preliminar de padronização, quatro genes (*RUNX3*, *CDKN2A*, *CDO1*, *SOCS1*) incluindo o controle endógeno (β -actina), apresentaram curvas-padrão adequadas, com valores de R^2 igual ou superior a 0,98 e eficiências dentro do intervalo aceitável (90–110%) (tabela 5). Entretanto, quando aplicados às amostras experimentais pareadas, apenas os genes *CDKN2A*, *RUNX3* mantiveram desempenho satisfatório, preservando a eficiência da reação e o formato esperado da curva de amplificação, permitindo assim a quantificação absoluta do DNA metilado de cada amostra. Os demais genes apresentaram perda de sensibilidade, baixa eficiência ou desvios na curva-padrão, impossibilitando o cálculo confiável do índice de metilação.

Tabela 5. Parâmetros das curvas padrão obtidas para os genes-alvo utilizados na padronização da reação de qPCR.

Gene	Eficiência (90-110%)	R^2 ($\geq 0,98$)
<i>B-ACTINA</i>	101.58%	0,99
<i>RUNX3</i>	99.93%	0,99
<i>CDKN2A</i>	91.66%	0,99
<i>CDO1</i>	99.70%	0,98
<i>SOCS1</i>	90.11%	0,98
<i>CRABP1</i>	89.06%	0,96
<i>MLH1</i>	78.13%	0,99
<i>IGF2</i>	63.52%	0.99
<i>NEUROG1</i>	112.35%	0.92

R^2 = coeficiente de determinação

A metilação do gene *CDKN2A* foi analisada em 35 amostras pareadas de tecido tumoral e não-tumoral adjacente de pacientes com CCR. Os valores de metilação foram calculados em

porcentagem e, para análise, foram transformados em escala logarítmica ($\log_{10}$). Observa-se que parte dos pacientes apresentam níveis de metilação mais elevados no gene *CDKN2A* no tecido tumoral, entretanto, esse padrão não é uniforme entre todos os casos, sugerindo heterogeneidade do perfil de metilação do *CDKN2A* entre pacientes (figura 7). A análise pareada não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,305$). Para determinar o potencial discriminatório do gene *CDKN2A* com base nos seus níveis de metilação, foi realizada a análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), que definiu um limiar ideal de -2.48 (na escala $\log_{10}$), associado uma sensibilidade de 54,29% e uma especificidade de 88,57% (Apêndice 9.1).

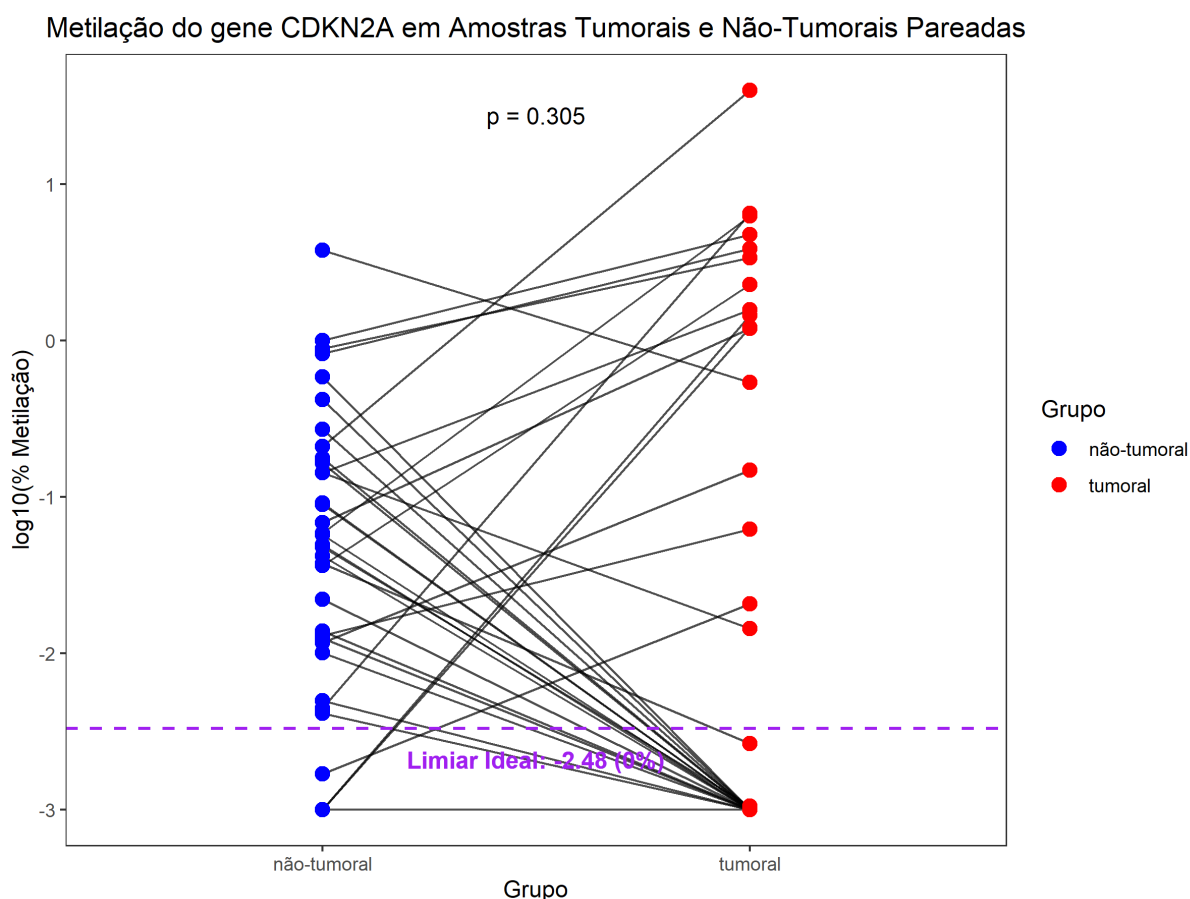


Figura 7. Gráfico de pontos pareados que exibe os níveis de metilação de *CDKN2A* ($\log_{10}$ -transformados) em amostras pareadas de tecidos não-tumorais (azul) e tumorais (vermelho). As diferenças na porcentagem de metilação entre os tecidos não-tumorais e tumorais, foram analisadas usando o teste não paramétrico de Wilcoxon. As linhas pretas conectam as amostras do mesmo paciente. O p -valor (0.305) do teste indica que não houve diferença estatística entre os grupos. A linha tracejada roxa representa o limiar ideal de -2.48 (0,0033% na escala original), determinado pela análise ROC para melhor discriminação (Sensibilidade = 54.29%; Especificidade = 88.57%).

A metilação do gene *RUNX3* também foi avaliada em 35 amostras pareadas de tecido tumoral e não-tumoral (figura 8). Diferente do observado no gene *CDKN2A*, a análise visual do gráfico de pontos não revelou uma tendência clara de aumento ou diminuição nos níveis de metilação. Essa observação foi confirmada pela análise estatística, que revelou que a diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa ($p = 0,4181$). Além disso, a análise da curva ROC confirmou a falta de poder discriminatório do gene *RUNX3*, com uma área sob a curva (AUC) de 0,496 (Apêndice 9.1). Desta forma este gene, não teve poder discriminatório para classificar amostras em metiladas e não metiladas.

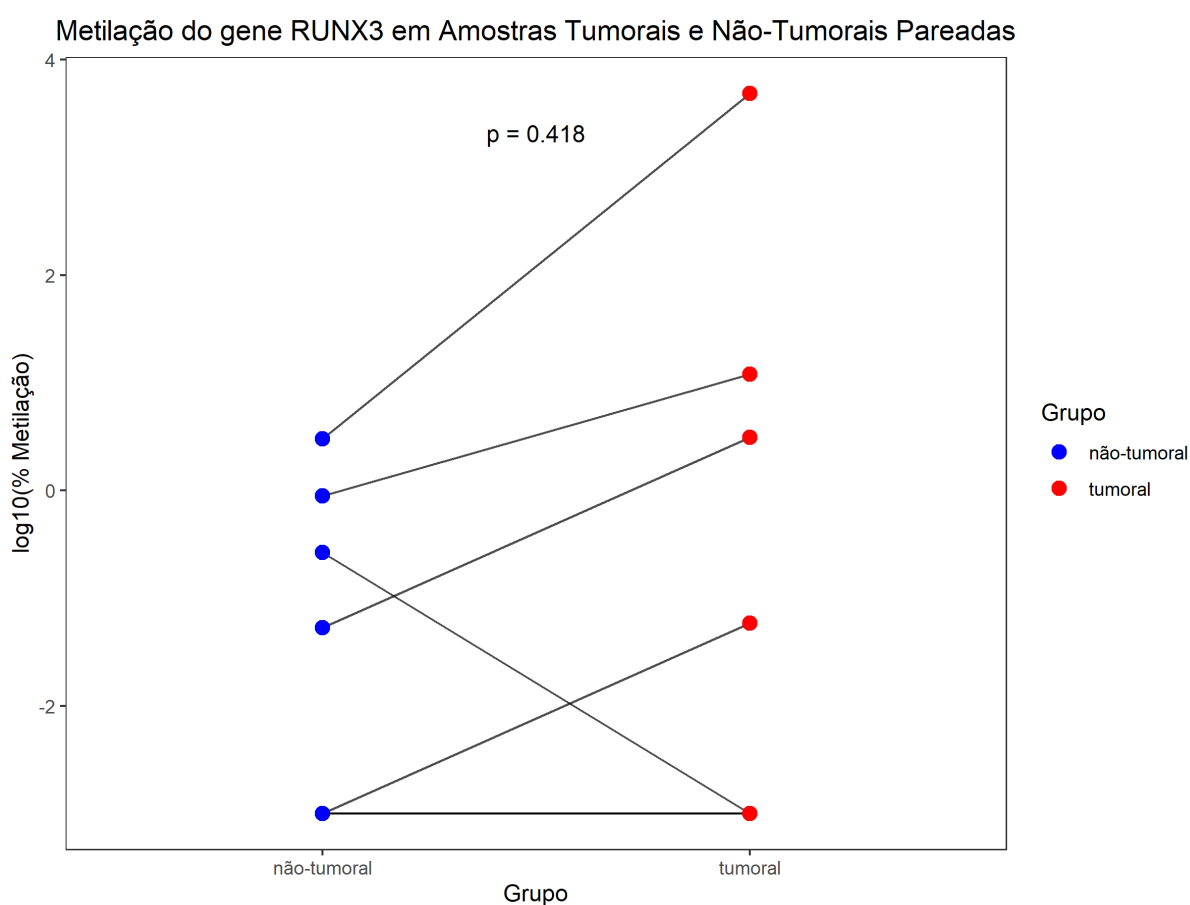


Figura 8. Gráfico de pontos pareados que exibe os níveis de metilação de RUNX3 (log10-transformados) em amostras pareadas de tecidos não-tumorais (azul) e tumorais (vermelho). As diferenças na porcentagem de metilação entre os tecidos não-tumorais e tumorais, foram analisadas usando o teste não paramétrico de Wilcoxon. As linhas pretas conectam as amostras do mesmo paciente. O p -valor (0.418) do teste indica que não houve diferença estatística entre os grupos. Um gráfico de suporte para esta análise está disponível no Apêndice 9.2.

5.5 Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a lateralidade do tumor (direito versus esquerdo).

Foi realizada a análise comparativa das concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a lateralidade do tumor direito (D) ou esquerdo (E).

As concentrações de IL-10 foram significativamente mais elevadas no cólon esquerdo ($p = 0.0018$). Por outro lado, a IL-17A apresentou diferença estatisticamente significativa com concentrações mais elevadas em pacientes com tumores localizados no cólon direito ($p = 0.0163$) (s).

As demais citocinas analisadas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre a lateralidade do tumor (todos $p > 0.05$).

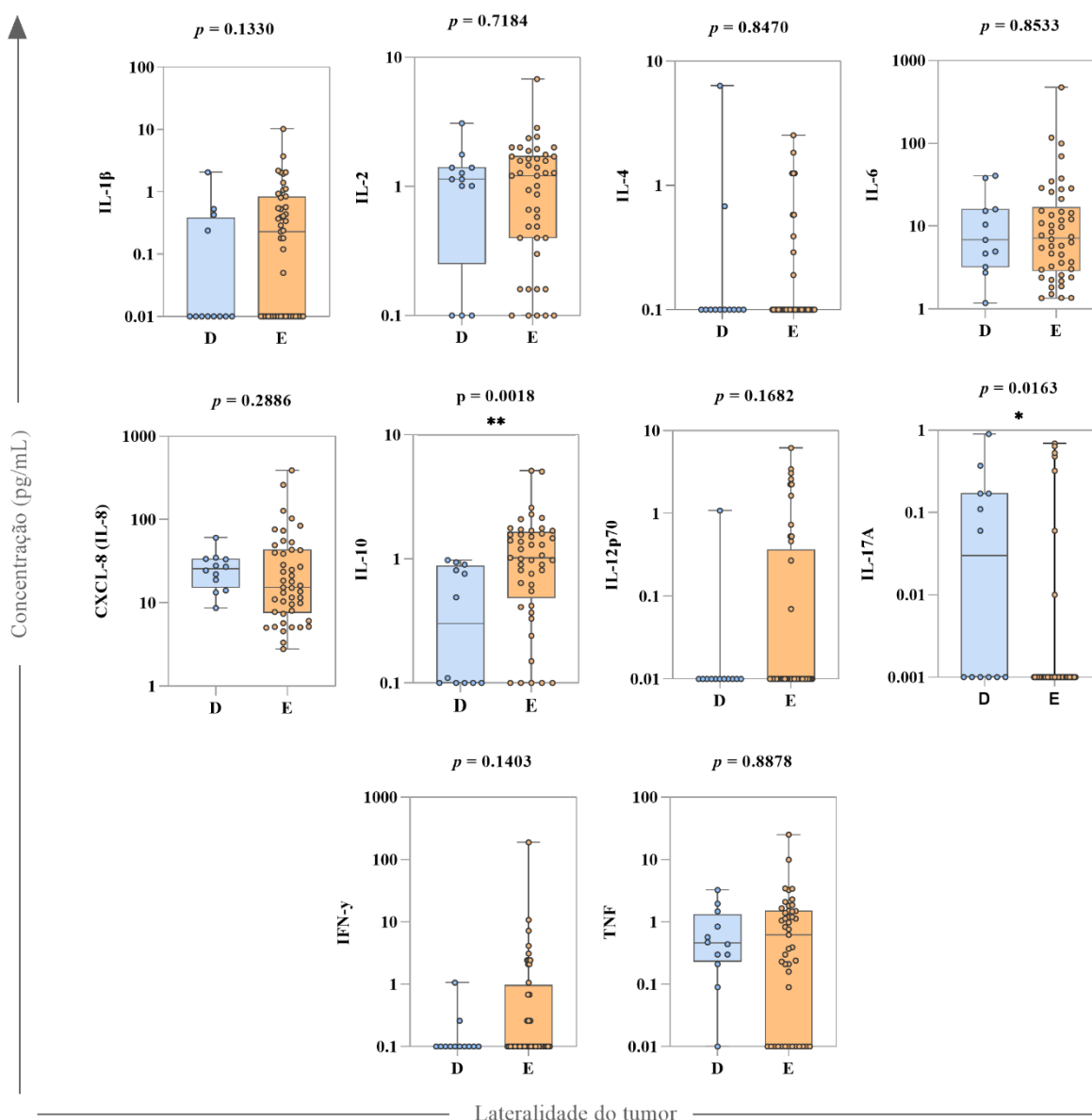


Figura 9. Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a lateralidade do cólon: direito (D) versus esquerdo (E). Os valores estão expressos em pg/mL. Os dados são representados em Boxplot com pontos individuais. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas representadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

5.6 Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com o estadiamento da doença.

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de citocinas em relação ao estadiamento da doença (I, II, III e IV). Observou-se diferença estatisticamente significativa para IL-6 ($p = 0,0043$) entre os estágios, com tendência de aumento nos estágios mais avançados e diferença significativa principalmente entre os estágios I e IV (p ajustado = 0,0083).

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas das demais citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-2, CXCL-8/IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- γ , TNF) entre os diferentes estágios do CCR (figura 10).

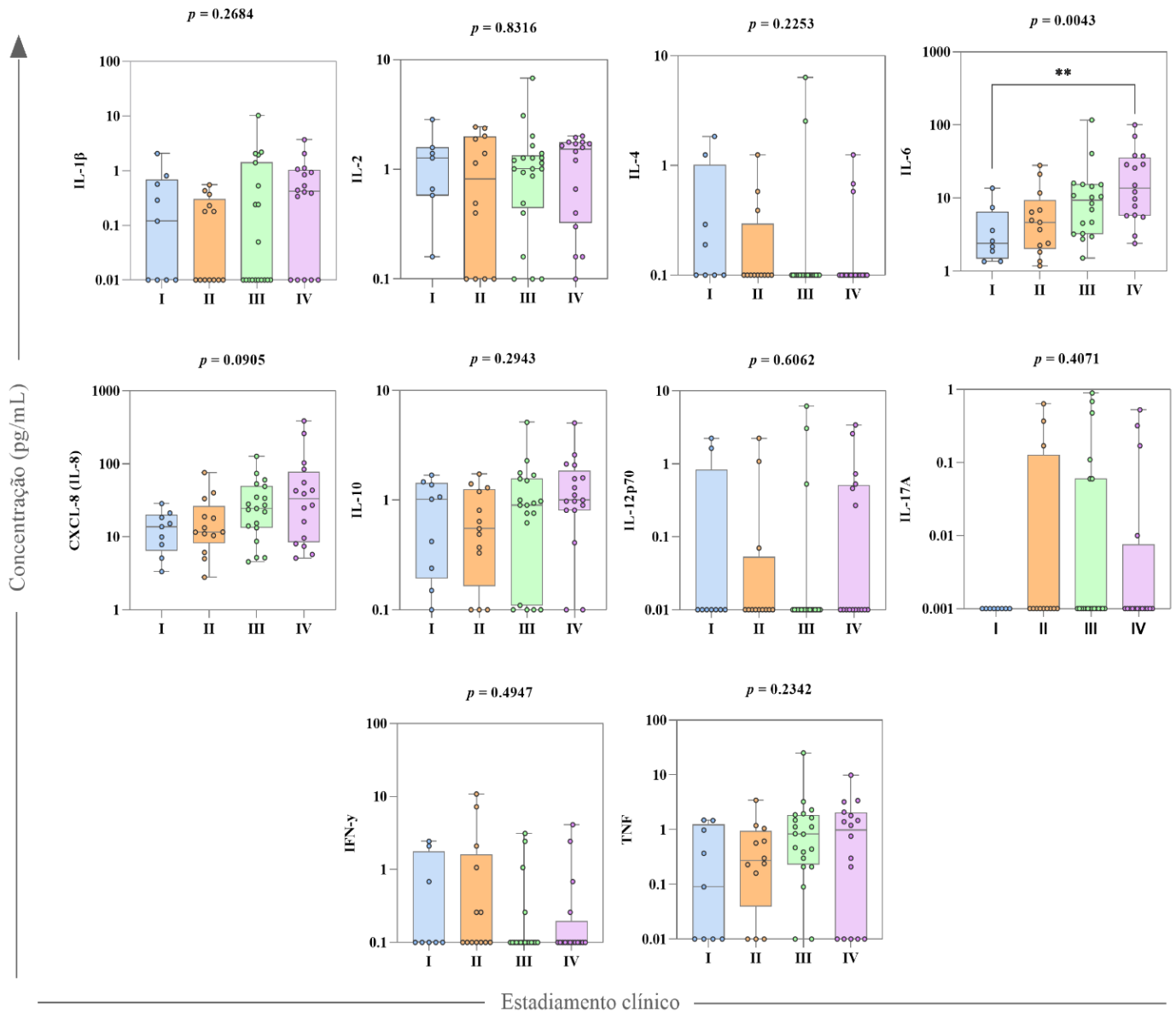


Figura 10. Concentrações plasmáticas de citocinas nos pacientes com câncer colorretal (CCR) por estadiamento da doença. Os valores estão expressos em pg/mL. Os dados são representados por Box Plots com pontos individuais. As análises estatísticas foram realizadas por Kruskal-Wallis (com pós-teste de Dunn) para os dados não-normais. Diferenças significativas foram destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

5.7 Concentrações plasmáticas de citocinas em relação a ausência ou presença de metástase.

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de citocinas dos pacientes com CCR na ausência ou presença de metástase. Observou-se que a citocina CXCL-8 (IL-8) apresentou concentrações plasmáticas mais elevadas e estatisticamente significativa ($p = 0,0446$) na presença de metástase. Nas demais citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- γ , TNF- α) não foi evidenciado significância estatística (figura 11).

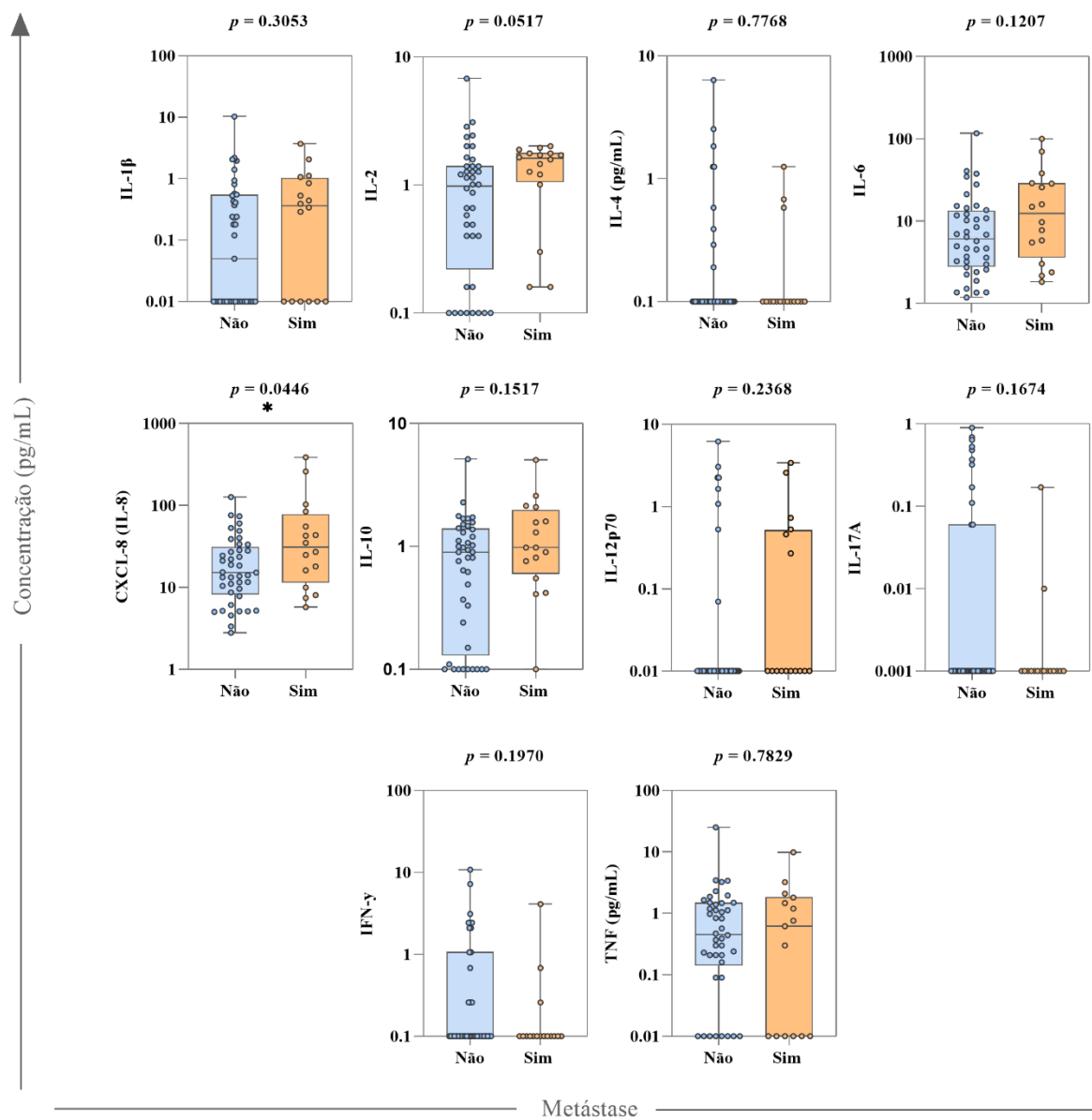


Figura 11. Concentrações plasmáticas de citocinas, de acordo com a presença ou ausência de metástase. Os valores estão expressos em pg/mL. Os dados são representados em Boxplot com pontos individuais. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são representadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

5.8 Correlação entre o padrão de metilação e citocinas.

Para avaliar a correlação entre os níveis metilação dos genes *CDKN2A* e *RUNX3* e as concentrações séricas de citocinas, foi realizada uma análise de correlação de Spearman. Observou-se que os níveis de metilação do gene *CDKN2A* não possui correlação estatisticamente significativa com nenhuma das citocinas analisadas (representada pelos círculos brancos). Em contraste, os níveis de metilação do gene *RUNX3* teve uma correlação negativa com a citocina IL-2 ($\rho = -0.43$) (representada pelo círculo azul). Indicando que à medida que a metilação do gene *RUNX3* aumenta, as concentrações de IL-2 tendem a diminuir. Ademais, observou-se a correlação positiva forte entre IL-6 e CXCL-8 (IL-8) ($\rho = 0.68$) (representada pelo círculo laranja). Isso sugere uma associação robusta e significativa entre essas duas citocinas, ou seja, à medida que os níveis de IL-6 aumentam, os de CXCL-8 também tendem a aumentar. Outras correlações positivas fortes são entre IL-6 e IL-12p70 (IL-8) ($\rho = 0.55$) bem como entre IL-1 β e TNF ($\rho = 0.59$) e IL-4 e INF- γ ($\rho = 0.51$) (figura 12).

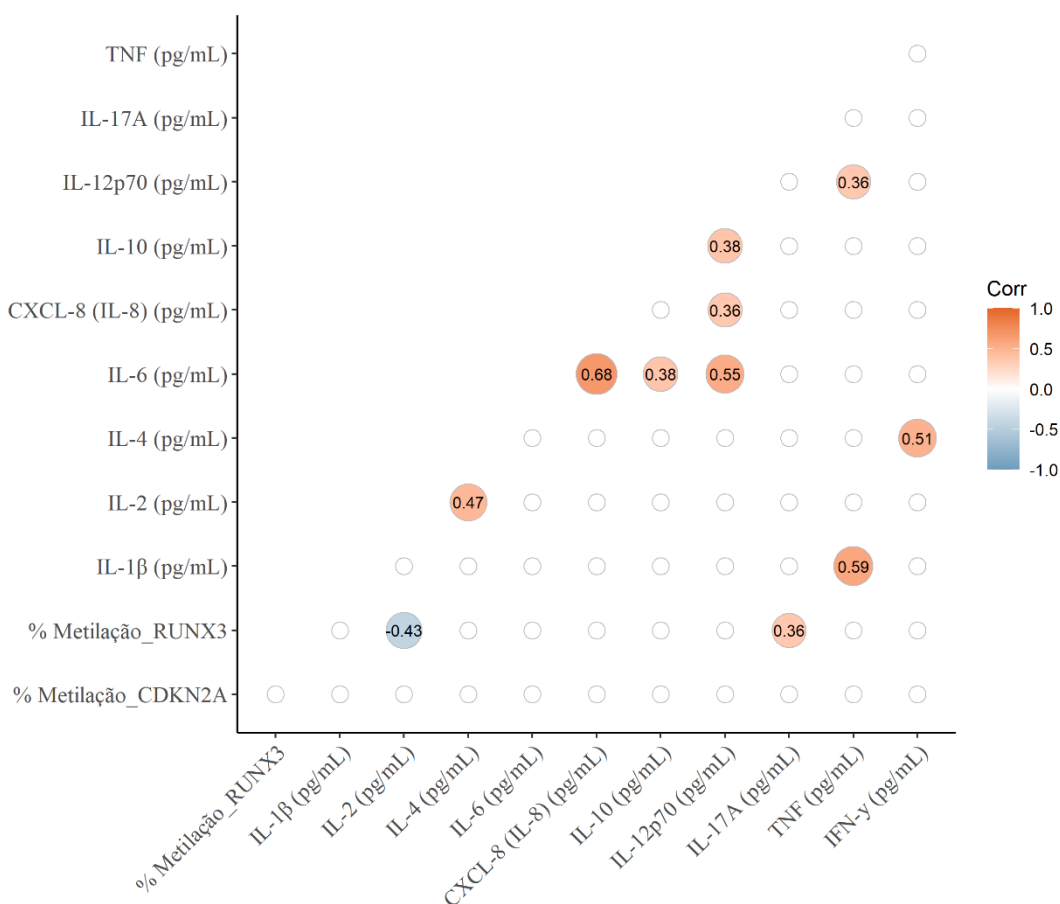


Figura 12. Mapa de calor da correlação de Spearman entre níveis de metilação dos genes *CDKN2A* e *RUNX3* e as concentrações séricas de citocinas. Os círculos coloridos representam os coeficientes de correlação (ρ), onde a cor e o tamanho do círculo indicam a força e a direção da associação. Tons de azul indicam correlação negativa e tons de laranja indicam correlação positiva. Círculos em branco representam correlações não estatisticamente significativas ($p > 0.05$).

Para avaliar o efeito das variáveis clínicas e patológicas nos níveis de metilação dos genes (*CDKN2A* e *RUNX3*) e das citocinas, realizou-se uma análise de regressão linear múltipla. Com o intuito de identificar quais dessas variáveis atuam como preditoras independentes dos resultados biológicos. Os resultados estão demonstrados no mapa de calor (figura 13). Observou-se uma associação positiva e estatisticamente significativa entre a lateralidade do tumor e as concentrações séricas de IL-10 ($\beta=1.6$, $p < 0,05$). Nenhuma das outras variáveis clínicas e patológicas (idade, gênero, estadiamento e *status* de metástase) demonstrou ser um

preditor estatisticamente significativo para os níveis de metilação dos genes *CDKN2A*, *RUNX3*, nem para as outras citocinas.

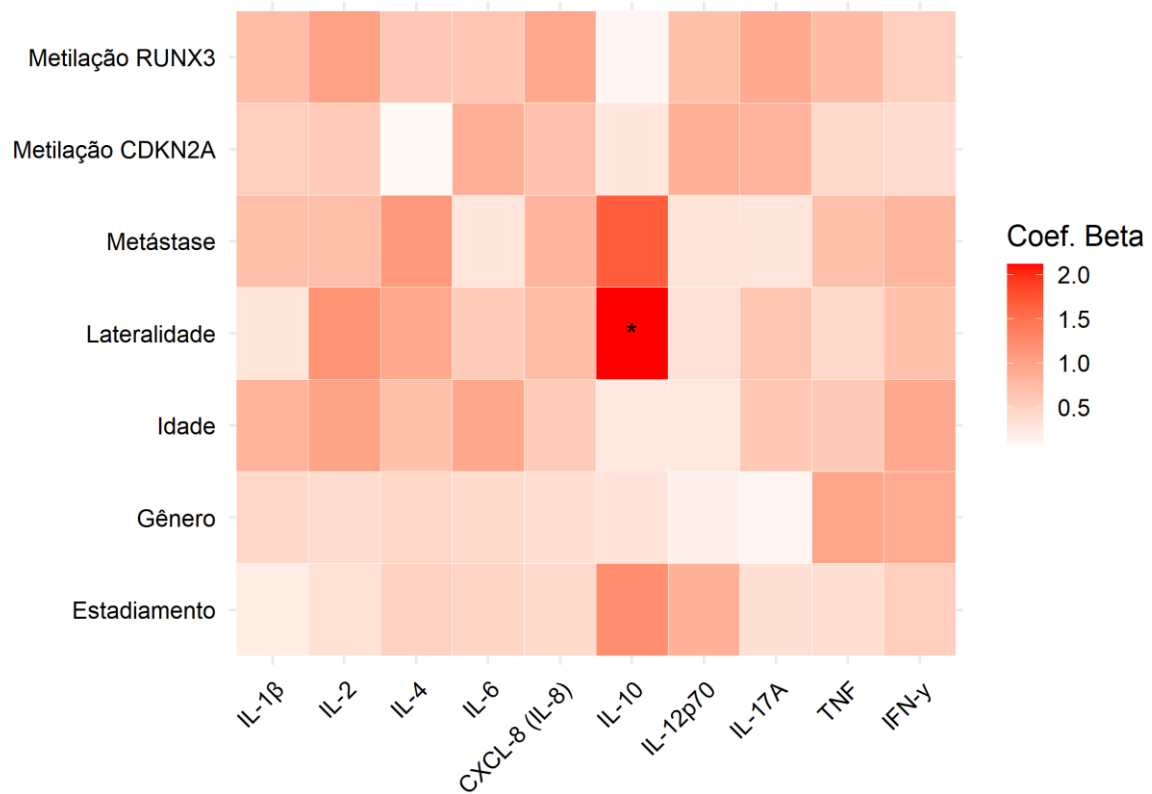


Figura 13. Mapa de calor dos coeficientes beta da análise de regressão linear múltipla. O gráfico representa os coeficientes de regressão (β) de um modelo multivariado, mostrando a influência das variáveis clínicas, patológicas, níveis de metilação de genes (linhas) e citocinas (colunas). A intensidade da cor laranja indica a magnitude do coeficiente beta. O asterisco (*) destaca uma associação estatisticamente significativa com $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou dados sociodemográficos, epidemiológicos, de estilo de vida, clínicos e patológicos de pacientes com diagnóstico câncer colorretal (CCR). Observou-se que a faixa etária dos 59 pacientes selecionados para o estudo variou entre 51-65 anos e >66 anos. Sabe-se que cerca de 90% de todos os novos casos de CCR ocorrem em indivíduos com mais de 50 anos (Sawicki *et al.*, 2021). A idade é considerada um dos fatores mais significativos que influenciam o risco de desenvolvimento de CCR. Pessoas com idade superior a 65 anos tem três vezes mais risco de desenvolver CCR em comparação com aqueles com idade entre 50-64 anos e cerca de 30 vezes mais risco do que pessoas entre 25-49 anos (Rawla; Sunkara; Barsouk, 2019). Sobretudo, o fato desta doença ser relacionada à idade é particularmente evidente em nações desenvolvidas, onde o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional contribuem para uma maior incidência (Sawicki *et al.*, 2021).

Os dados de estimativa gerados pelo Instituto Nacional de Câncer no Brasil apontam que o CCR é o segundo mais prevalentes em homens e o terceiro mais prevalente em mulheres. No entanto, no Amazonas há uma diferença significativa de incidência em ambos os sexos, visto ser mais prevalente em mulheres (7,47/100 mil) em comparação aos homens (6,20/100 mil) (INCA, 2023). Este dado, corrobora com os dados apresentados neste estudo. Essa diferença ainda não é bem compreendida, mas pode estar relacionada a exposição aos fatores de risco (tabagismo, álcool, padrões alimentares regulares de carnes vermelhas e processados) (American Cancer Society, 2017).

Notou-se ainda que a maioria da população estudada apresentava IMC com indicativo de sobrepeso no momento do diagnóstico. Homens e mulheres com sobrepeso ou obesidade tem cerca de 50% mais riscos de desenvolver câncer em comparação com pessoas com peso normal (Sawicki *et al.*, 2021). Estima-se que o risco global do CCR aumente em 3% para cada cinco quilos de ganho de peso. Este fato, muitas vezes se dá como resultado de sedentarismo. Pessoas fisicamente inativas tem risco até 50% maior de desenvolver o CCR em comparação às mais ativas fisicamente (American Cancer Society, 2017).

Em relação ao tabagismo, sabe-se ainda que aqueles que fumam ou já fumaram têm risco aumentado para muitos tipos de câncer, incluindo o CCR (Sawicki *et al.*, 2021). Uma metanálise recente de 14 estudos de coorte prospectivos mostrou que tabagismo anterior (HR = 1,12; 95% IC: 1,04–1,20) e atual (HR = 1,29, IC 95%: 1,04–1,60) foram associados a pior prognóstico do CCR em comparação com nunca fumar e fumar atual (Ordóñez-Mena *et al.*, 2018).

Da mesma forma, a ingestão de álcool é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento do câncer. Estima-se que 21,9% dos novos casos de CCR são atribuídos ao consumo de álcool em todo o mundo, em ambos os sexos (IARC, 2024). No Brasil, essa estimativa não é diferente (21,9%) (IARC, 2024). Em metanálise de 16 estudos realizando associação do álcool com o CCR, verificou-se que o consumo excessivo de álcool foi associado a um aumento significativo do risco (OR: 1,25, IC 95%: 1,11–1,40) (McNabb *et al.*, 2020).

A dieta também desempenha um papel adverso ou protetor no desenvolvimento do CCR, independente da obesidade. O consumo regular de carnes vermelhas e processadas é um importante fator de risco para o desenvolvimento de CCR (Aykan, 2015). Estima-se que o risco de CCR pode aumentar em cerca de 17% para cada porção de 100 gramas de carne vermelha e em aproximadamente 18% para cada 50 gramas de carne processada consumida diariamente (Sawicki *et al.*, 2021)

Quanto aos sintomas relatados pelos pacientes deste estudo, destacamos que a perda ponderal, constipação, dor abdominal e alteração do hábito intestinal, foram os sintomas mais comuns. Deve-se considerar que há poucos sintomas óbvios relatados no início da doença, o CCR desenvolve mais sintomas na fase média e tardia, e muitas vezes pode ser uma das razões pelo qual os pacientes procuram atendimento médico tardio (Rasmussen *et al.*, 2015). No Brasil, sintomas como mudanças de hábitos intestinais (diarreia ou constipação), anemia, perda inexplicável de peso, fezes escuras ou com sangue visível, massa abdominal, dor ou desconforto abdominal, são considerados bons indicadores para a suspeita do CCR, o que facilita os pacientes a serem encaminhados de uma unidade básica de saúde para a atenção especializada, a fim de investigar e confirmar o diagnóstico (INCA, 2021).

Neste estudo, obtivemos ainda as características clínico e patológicas dos pacientes com CCR. Sabe-se que o CCR é uma doença heterogênea e vai diferir quanto a localização do tumor, grau de malignidade e tipo histológico, tais características e informações podem prever o prognóstico, as melhores opções de tratamento e os desfechos clínicos do paciente (Marzouk; Schofield, 2011). O estágio da doença e a presença de metástase, afetam sobremaneira as taxas de sobrevida. No momento do diagnóstico do CCR, aproximadamente 80% são localizados, enquanto 20% têm metástases para locais distantes (Thanikachalam; Khan, 2019). A posição do tumor no CCR também são características importantes, pois se comportam de forma diferente em termos de progressão da doença e sobrevida global. Pacientes com CCR à direita, por exemplo, tendem a ter tumores maiores e mais avançados e muitas vezes são pouco diferenciados. Em contrapartida, os tumores esquerdos, é mais fácil detectá-los com a

colonoscopia nos estágios iniciais da carcinogênese, além de responder melhor ao tratamento como a quimioterapia (Baran *et al.*, 2018).

Nossos achados para o padrão de metilação dos genes *CDKN2A* e *RUNX3* em amostras pareadas de tecido tumoral e não tumoral foram distintos, embora ambos os resultados não tenham sido estatisticamente significativos. Apesar de o gene *CDKN2A* tenha apresentado aumento da metilação no tecido tumoral, esse padrão não foi uniforme, refletindo uma heterogeneidade entre as amostras. Estudos anteriores, descrevem este gene como hipermetilado em 12 a 51% dos CCRs, sendo frequentemente incluído no painel de marcadores usados para avaliar o fenótipo CIMP (Shima *et al.*, 2011). Em estudo conduzido por Almeida *et al.* (2015) em pacientes do Amazonas, observou-se a presença de metilação moderada do *CDKN2A*, embora não tenha apresentado destaque expressivo em relação a outros genes (Almeida *et al.*, 2015). Nossos achados sugerem que, no contexto estudado, o *CDKN2A* pode desempenhar um papel epigenético relevante, porém menos dominante.

Em contrapartida, o gene *RUNX3*, não demonstrou um padrão consistente de metilação. Esse achado diverge da literatura, que sugere que a hipermetilação deste gene pode ser um preditor de prognóstico desfavorável no CCR, aumentando o risco de progressão tumoral (Mu *et al.*, 2014). Embora em estudo de Shin, *et al.* (2018) tenham encontrado uma porcentagem considerável (32,3%) de hipermetilação em amostras tumorais de CCR, nossos resultados indicam que essa particularidade epigenética não é prevalente na população estudada.

Nosso estudo propôs-se ainda a investigar as concentrações plasmáticas de citocinas quanto a lateralidade do tumor, estadiamento da doença e presença de metástase em pacientes com câncer colorretal. A literatura sugere que perfis de citocinas alterados estão diretamente relacionados ao prognóstico dos pacientes (Czajka-Francuz *et al.*, 2021).

Nossos resultados demonstraram que a concentração das citocinas IL-10 e IL-17A difere significativamente de acordo com a lateralidade do tumor no câncer colorretal (CCR). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, imunossupressora que desempenha um papel complexo no desenvolvimento do CCR (Wei; Wang; Li, 2020). Concentrações aumentadas desta citocina geralmente são encontradas durante a progressão da doença e quanto menores as concentrações de expressão, menos recidiva, melhor prognóstico e maior sobrevida (Baosong Li *et al.*, 2019). Nossos achados corroboram com o estudo de Farc *et al.* (2022), que relatou aumento significativo dos níveis de IL-10 em tumores localizados no lado esquerdo do cólon. Por outro lado, a IL-17 apresentou-se aumentada em pacientes com tumores do lado direito, conhecidos por serem mais agressivos e resistentes às terapias em comparação com os tumores do lado esquerdo. Além de sua função pró-inflamatória, a IL-17 pode potencializar a atividade

imunossupressora das células T reguladoras (Tregs), aumentar a expressão de PD-L1 e promover a resistência à terapia anti-PD-1 (Chung *et al.*, 2013; Liu, C. *et al.*, 2021).

Além da lateralidade, nossos achados demonstram que os níveis de IL-6 são significativamente maiores em estágios mais avançados do CCR, principalmente quando comparados entre os estágios I e IV. A IL-6 é uma citocina inflamatória com propriedades estimulantes e inibidoras do câncer. Níveis aumentados desta citocina estão associados ao aumento dos estágios e tamanho do tumor, com metástase e diminuição da sobrevida (Knüpfer; Preiss, 2010; Feng *et al.*, 2023). Identificamos ainda em nosso estudo, que as concentrações de CXCL8 (IL8) se apresentaram significativamente mais elevadas em pacientes CCR que já haviam desenvolvido metástase. A CXCL-8 também conhecida como IL-8 uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel importante regulando o processo de angiogênese, crescimento e proliferação tumoral, assim como a sobrevivência de células malignas (Chang, W.-J. *et al.*, 2014). Além disso, concentrações elevadas de IL-8 estão associadas ao mau prognóstico, principalmente em pacientes em estágio avançado ou aqueles com metástase (Pączek *et al.*, 2020). Sendo sugerido que seu nível sérico pode ser um importante biomarcador para identificar pacientes de alto risco (Wen-Jun Jin *et al.*, 2014).

Embora, nosso estudo não tenha revelado uma associação estatística entre as demais citocinas e os parâmetros avaliados, é importante salientar que elas desempenham papéis importantes na modulação da resposta imune e na progressão do câncer colorretal. Por exemplo, um estudo de Chang *et al.* (2016) que avaliou níveis aumentados de IL-1 β , IL-6, TNF- α antes do tratamento e correlacionou as características clinicopatológicas e a progressão do CCR. Da mesma forma, Zheng *et al.* (2022) relataram que níveis aumentados de IL-12p70 no plasma de pacientes com CCR estão associados a metástase linfática, estadiamento da doença e à localização do tumor. Ressalta-se ainda, que há muitas variáveis, como tabagismo, obesidade, ingestão dietética que estão relacionadas ao estado de inflamação e consequente alteração dos níveis de citocinas, porém não foram incluídos na análise deste estudo.

De forma integrada, os resultados também demonstraram que a metilação de *CDKN2A* não se correlacionou com o perfil de citocinas, ao passo que a metilação de *RUNX3* associou-se negativamente à IL-2. Este é um achado importante e que merece investigações futuras. Este resultado pode ser embasado pela literatura, que descreve o papel do RUNX3 como um fator de transcrição essencial para a ativação e proliferação de células T e NK, as quais são diretamente estimuladas pela IL-2 (Lotem *et al.*, 2013). Além disso, foram observadas correlações positivas significativas entre IL-6/CXCL-8, IL-6/IL-12p70, TNF/IL-1 β e IL-4/INF- γ . A literatura descreve que o TNF e a IL-1 β iniciam uma cascata inflamatória, que se interliga

à IL-6 e à CXCL-8 (IL-8), ambas conhecidas por promoverem a proliferação celular, angiogênese e metástase no câncer (Borowczak *et al.*, 2022). A correlação positiva entre IL-6 e IL-12p70 pode indicar um microambiente inflamatório misto, em que a inflamação crônica (IL-6) convive com sinais de ativação imune adaptativa (IL-12p70), enquanto a correlação observada entre IL-4 e IFN- γ pode parecer contraditória, pois IL-4 (perfil Th2) e IFN- γ (perfil Th1) geralmente sinalizam respostas opostas; contudo, em tumores é comum encontrar microambientes mistos, com ativação simultânea de vias pró-inflamatórias e regulatórias (Jorgovanovic *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2022)

No contexto clínico, apenas a lateralidade tumoral mostrou influência independente, associando-se ao aumento de IL-10, o que reforça o papel da localização do tumor na modulação da resposta imunológica tem um impacto significativo na resposta imunológica e no prognóstico do paciente, como abordado anteriormente.

Em suma, este estudo sugere que a interação entre alterações epigenéticas, as concentrações das citocinas e as particularidades clínicas dos tumores pode contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de progressão tumoral no câncer colorretal.

Este estudo apresentou algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A obtenção de dados de metilação de um painel mais amplo de genes mostrou-se tecnicamente desafiadora, o que impossibilitou a classificação das amostras em fenótipos CIMP. A redução do número final de amostras, decorrente de perdas técnicas observadas ao longo das etapas experimentais, pode ter comprometido o poder estatístico do estudo. Entre os fatores que contribuíram para essas perdas, destaca-se a eficiência variável da conversão por bissulfito (uma etapa sensível e suscetível a variações) que pode ter afetado diretamente a qualidade das reações e, conseqüentemente, a reprodutibilidade das curvas padrão. Soma-se a isso a possível instabilidade do reagente controle de metilação, cuja degradação ou perda de características químicas ao longo do tempo pode ter impactado negativamente tanto o desempenho das reações quanto a robustez dos resultados obtidos.

Outro aspecto relevante refere-se ao uso de tecido não tumoral adjacente como controle. Apesar de ser um procedimento amplamente adotado em estudos translacionais, essa região pode apresentar alterações moleculares iniciais relacionadas ao processo de tumorigênese (conhecido como contaminação molecular). Assim, é possível que parte das diferenças observadas entre tecido tumoral e não tumoral tenha sido reduzida ou parcialmente mascarada pela presença de alterações pré-neoplásicas no tecido controle, constituindo uma limitação importante.

Além disso, algumas citocinas, como a IL-1 β , apresentam baixa estabilidade em amostras biológicas, podendo se degradar rapidamente caso o processamento, congelamento e armazenamento não ocorram de forma imediata e controlada. Essa característica intrínseca pode ter contribuído para variabilidade ou baixa detecção de determinadas citocinas, configurando uma limitação adicional na interpretação dos resultados relacionados ao perfil inflamatório.

Por fim, a ausência de controle de variáveis como tabagismo, obesidade e ingestão dietética (fatores associados ao estado inflamatório sistêmico e às concentrações de citocinas) constitui mais uma limitação relevante e deve ser considerada na interpretação dos achados.

7 CONCLUSÕES

- Este estudo evidenciou que fatores sociodemográficos, epidemiológicos e de estilo de vida contribuem para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal (CCR);
- Observou-se heterogeneidade nos padrões de metilação dos genes *CDKN2A* e *RUNX3*;
- Verificou-se diferença no perfil de citocinas inflamatórias de acordo com a lateralidade tumoral, com níveis mais elevados de IL-10 em tumores do cólon esquerdo e de IL-17A em tumores do cólon direito;
- Sugere-se diferença no perfil de citocinas de acordo com a progressão do CCR, com IL-6 aumentada em estágios avançados e IL-8 mais elevada na presença de metástase;
- As correlações positivas observadas entre IL-6/CXCL-8, IL-6/IL-12p70, TNF/IL-1 β e IL-4/INF- γ , destacam a complexa rede inflamatória envolvida na progressão tumoral do CCR;
- Sugere-se que o silenciamento epigenético do *RUNX3* correlaciona-se com a redução de IL-2 em CCR, cujo significado biológico requer investigação mais aprofundada..

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S.; KAWAI, K.; NOZAWA, H.; SASAKI, K.; MURONO, K.; EMOTO, S.; OZAWA, T.; YOKOYAMA, Y.; NAGAI, Y.; ANZAI, H.; SONODA, H.; YAMAUCHI, S.; SUGIHARA, K.; ISHIHARA, S. Clinical impact of primary tumor sidedness and sex on unresectable post-recurrence survival in resected pathological stage II-III colorectal cancers: a nationwide multicenter retrospective study. **BMC Cancer**, [N.p.], vol. 22, p. 486, 2 maio 2022. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09615-z>.

ADVANI, S. M.; ADVANI, P. S.; BROWN, D. W.; DESANTIS, S. M.; KORPHAISARN, K.; VONVILLE, H. M.; BRESSLER, J.; LOPEZ, D. S.; DAVIS, J. S.; DANIEL, C. R.; SARSHEKEH, A. M.; BRAITHWAITE, D.; SWARTZ, M. D.; KOPETZ, S. Global differences in the prevalence of the CpG island methylator phenotype of colorectal cancer. **BMC Cancer**, [N.p.], vol. 19, nº 1, p. 964, dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6144-9>.

AJCC. **Colon and Rectum. In: AJCC Cancer Staging Manual**. 8th ed. New York; NY: Springer; American Joint Committee on Cancer., 2017. ed 8th ed. (Chapter 20).

AL OBEED, O. A.; ALKHAYAL, K. A.; AL SHEIKH, A.; ZUBAIDI, A. M.; VAALI-MOHAMMED, M.-A.; BOUSHEY, R.; MCKERROW, J. H.; ABDULLA, M.-H. Increased expression of tumor necrosis factor- α is associated with advanced colorectal cancer stages. **World Journal of Gastroenterology**, [N.p.], vol. 20, nº 48, p. 18390–18396, 28 dez. 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18390>.

ALJAMA, S.; LAGO, E. P.; ZAFRA, O.; SIERRA, J.; SIMÓN, D.; SANTOS, C.; PASCUAL, J. R.; GARCIA-ROMERO, N. Dichotomous colorectal cancer behaviour. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [N.p.], vol. 189, p. 104067, set. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.104067>.

ALMEIDA, F. G. O.; DE AQUINO, P. F.; DE SOUZA, A. D. L.; DE SOUZA, A. Q. L.; DO CARMO VINHOTE, S.; MAC-CORMICK, T. M.; DA MOTA SILVA, M. S.; CHALUB, S. R. S.; DE SALDANHA DA GAMA FISCHER, J.; CARVALHO, P. C.; DA GLORIA DA COSTA CARVALHO, M. Colorectal cancer DNA methylation patterns from patients in Manaus, Brazil. **Biological Research**, [N.p.], vol. 48, nº 1, p. 50, 12 set. 2015. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0042-7>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019. [N.p.], nº Atlanta: American Cancer Society, 2017.

APTE, R. N.; VORONOV, E. Immunotherapeutic approaches of IL-1 neutralization in the tumor microenvironment. **Journal of Leukocyte Biology**, [N.p.], vol. 102, nº 2, p. 293–306, ago. 2017. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR1216-523R>.

AYKAN, N. F. Red Meat and Colorectal Cancer. **Oncology Reviews**, [N.p.], vol. 9, nº 1, p. 288, 28 dez. 2015. <https://doi.org/10.4081/oncol.2015.288>.

BAIDOUN, F.; ELSHIWY, K.; ELKERAIE, Y.; MERJANEH, Z.; KHOUDARI, G.; SARMINI, M. T.; GAD, M.; AL-HUSSEINI, M.; SAAD, A. Colorectal Cancer Epidemiology:

Recent Trends and Impact on Outcomes. **Current Drug Targets**, [N.p.], vol. 22, n° 9, p. 998–1009, nov. 2020.

BAOSONG LI; FENGXIA WANG; CHONG MA; TAO HAO; LONGLONG GENG; HONG JIANG. Predictive value of IL-18 and IL-10 in the prognosis of patients with colorectal cancer. **Oncology Letters**, [N.p.], vol. 18, n° 1, p. 713–719, jul. 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10338>.

BARAN, B.; MERT OZUPEK, N.; YERLI TETIK, N.; ACAR, E.; BEKCIOGLU, O.; BASKIN, Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. **Gastroenterology Research**, [N.p.], vol. 11, n° 4, p. 264–273, ago. 2018. <https://doi.org/10.14740/gr1062w>.

BERGMAN, D.; HALJE, M.; NORDIN, M.; ENGSTRÖM, W. Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. **Gerontology**, [N.p.], vol. 59, n° 3, p. 240–249, 20 dez. 2012. <https://doi.org/10.1159/000343995>.

BOGAERT, J.; PRENEN, H. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annals of Gastroenterology**, [N.p.], vol. 27, n° 1, p. 9–14, 2014. <https://doi.org/PMCID: PMC3959535>.

BOROWCZAK, J.; SZCZERBOWSKI, K.; MANIEWSKI, M.; KOWALEWSKI, A.; JANICZEK-POLEWSKA, M.; SZYLBERG, A.; MARSZAŁEK, A.; SZYLBERG, Ł. The Role of Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Colorectal Carcinoma—Recent Findings and Review. **Biomedicines**, [N.p.], vol. 10, n° 7, p. 1670, 11 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071670>.

BRAIT, M.; LING, S.; NAGPAL, J. K.; CHANG, X.; PARK, H. L.; LEE, J.; OKAMURA, J.; YAMASHITA, K.; SIDRANSKY, D.; KIM, M. S. Cysteine Dioxygenase 1 Is a Tumor Suppressor Gene Silenced by Promoter Methylation in Multiple Human Cancers. **PLoS ONE**, [N.p.], vol. 7, n° 9, p. e44951, 27 set. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044951>.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **The Lancet**, [N.p.], vol. 383, n° 9927, p. 1490–1502, abr. 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).

BUNT, S. K.; SINHA, P.; CLEMENTS, V. K.; LEIPS, J.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [N.p.], vol. 176, n° 1, p. 284–290, 1 jan. 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.284>.

BUNT, S. K.; YANG, L.; SINHA, P.; CLEMENTS, V. K.; LEIPS, J.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. **Cancer Research**, [N.p.], vol. 67, n° 20, p. 10019–10026, 15 out. 2007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2354>.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, [N.p.], vol. 55, n° 4, p. 611–622, 1 abr. 2009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

BUSTIN, S. A.; RUIJTER, AN M. R.; VAN DEN HOFF, MAURICE J.B; KUBISTA, MIKAEL; W. PFAFFL, MICHAEL; SHIPLEY, GREGORY L; TRAN, NHAM; RÖDIGER, STEFAN; UNTERGASSER, ANDREAS; MUELLER, REINHOLD; NOLAN, TANIA; MILAVEC, MOJCA; BURNS, MALCOLM J; HUGGETT, JIM F; VANDESOMPELE, JO; WITTEWER, CARL T. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. **MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines**, [N.p.], vol. 71, n° 6, p. 615–724, jun. 2025. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf034>.

CAMPAN, M.; WEISENBERGER, D. J.; TRINH, B.; LAIRD, P. W. MethyLight. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [N.p.], vol. 507, p. 325–337, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-522-0_23.

CHA, Y.; KIM, K.-J.; HAN, S.-W.; RHEE, Y. Y.; BAE, J. M.; WEN, X.; CHO, N.-Y.; LEE, D.-W.; LEE, K.-H.; KIM, T.-Y.; OH, D.-Y.; IM, S.-A.; BANG, Y.-J.; JEONG, S.-Y.; PARK, K. J.; KANG, G. H.; KIM, T.-Y. Adverse prognostic impact of the CpG island methylator phenotype in metastatic colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, [N.p.], vol. 115, n° 2, p. 164–171, 12 jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.176>.

CHANG, P.-H.; PAN, Y.-P.; FAN, C.-W.; TSENG, W.-K.; HUANG, J.-S.; WU, T.-H.; CHOU, W.-C.; WANG, C.-H.; YEH, K.-Y. Pretreatment serum interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α levels predict the progression of colorectal cancer. **Cancer Medicine**, [N.p.], vol. 5, n° 3, p. 426–433, mar. 2016. <https://doi.org/10.1002/cam4.602>.

CHANG, W.-J.; DU, Y.; ZHAO, X.; MA, L.-Y.; CAO, G.-W. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [N.p.], vol. 20, n° 16, p. 4586–4596, 28 abr. 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i16.4586>.

CHONOV, D. C.; IGNATOVA, M. M. K.; ANANIEV, J. R.; GULUBOVA, M. V. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, [N.p.], vol. 7, n° 14, p. 2391–2398, 20 jul. 2019. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.589>.

CHUNG, A. S.; WU, X.; ZHUANG, G.; NGU, H.; KASMAN, I.; ZHANG, J.; VERNES, J.-M.; JIANG, Z.; MENG, Y. G.; PEALE, F. V.; OUYANG, W.; FERRARA, N. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. **Nature Medicine**, [N.p.], vol. 19, n° 9, p. 1114–1123, set. 2013. <https://doi.org/10.1038/nm.3291>.

CZAJKA-FRANCUZ, P.; CISOŃ-JUREK, S.; CZAJKA, A.; KOZACZKA, M.; WOJNAR, J.; CHUDEK, J.; FRANCUZ, T. Systemic Interleukins' Profile in Early and Advanced Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 23, n° 1, p. 124, 23 dez. 2021a. <https://doi.org/10.3390/ijms23010124>.

CZAJKA-FRANCUZ, P.; CISOŃ-JUREK, S.; CZAJKA, A.; KOZACZKA, M.; WOJNAR, J.; CHUDEK, J.; FRANCUZ, T. Systemic Interleukins' Profile in Early and Advanced Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 23, n° 1, p. 124, 23 dez. 2021b. <https://doi.org/10.3390/ijms23010124>.

DE PALMA, F.; D'ARGENIO, V.; POL, J.; KROEMER, G.; MAIURI, M.; SALVATORE, F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. **Cancers**, [N.p.], vol. 11, n° 7, p. 1017, 20 jul. 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11071017>.

DEKKER, E.; TANIS, P. J.; VLEUGELS, J. L. A.; KASI, P. M.; WALLACE, M. B. Colorectal cancer. **The Lancet**, [N.p.], vol. 394, n° 10207, p. 1467–1480, out. 2019. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).

DIENSTMANN, R.; VERMEULEN, L.; GUINNEY, J.; KOPETZ, S.; TEJPAR, S.; TABERNERO, J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, [N.p.], vol. 17, n° 2, p. 79–92, fev. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.126>.

DMITRIEVA-POSOTTO, O.; DZUTSEV, A.; POSOTTO, D. F.; HOU, V.; YUAN, W.; THOVARAI, V.; MUFAZALOV, I. A.; GUNZER, M.; SHILOVSKIY, I. P.; KHAITOV, M. R.; TRINCHIERI, G.; WAISMAN, A.; GRIVENNIKOV, S. I. Cell-type specific responses to interleukin-1 control microbial invasion and tumor elicited inflammation in colorectal cancer. **Immunity**, [N.p.], vol. 50, n° 1, p. 166–180.e7, 15 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.015>.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature Reviews. Immunology**, [N.p.], vol. 6, n° 11, p. 836–848, nov. 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1961>.

EADS, C. A.; DANENBERG, K. D.; KAWAKAMI, K.; SALTZ, L. B.; BLAKE, C.; SHIBATA, D.; DANENBERG, P. V.; LAIRD, P. W. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Research**, [N.p.], vol. 28, n° 8, p. e32, 15 abr. 2000.

EDWARDS, J. R.; YARYCHKIVSKA, O.; BOULARD, M.; BESTOR, T. H. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics & Chromatin**, [N.p.], vol. 10, n° 1, p. 23, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8>.

ENDO, T. A.; MASUHARA, M.; YOKOUCHI, M.; SUZUKI, R.; SAKAMOTO, H.; MITSUI, K.; MATSUMOTO, A.; TANIMURA, S.; OHTSUBO, M.; MISAWA, H.; MIYAZAKI, T.; LEONOR, N.; TANIGUCHI, T.; FUJITA, T.; KANAKURA, Y.; KOMIYA, S.; YOSHIMURA, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. **Nature**, [N.p.], vol. 387, n° 6636, p. 921–924, jun. 1997. <https://doi.org/10.1038/43213>.

ENGEL, M. A.; NEURATH, M. F. Anticancer Properties of the IL-12 Family - Focus on Colorectal Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, [N.p.], vol. 17, n° 29, p. 3303–3308, 2010.

FARC, O.; BERINDAN-NEAGOE, I.; ZAHARIE, F.; BUDISAN, L.; ZANOAGA, O.; CRISTEA, V. A role for serum cytokines and cell adhesion molecules in the non-invasive diagnosis of colorectal cancer. **Oncology Letters**, [N.p.], vol. 24, n° 3, p. 323, 26 jul. 2022. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13443>.

FENG, S.; LI, Z.; LIU, M.; YE, Q.; XUE, T.; YAN, B. Postoperative serum interleukin-6 levels correlate with survival in stage I-III colorectal cancer. **BMC Gastroenterology**, [N.p.], vol. 23, n° 1, p. 156, 16 maio 2023. <https://doi.org/10.1186/s12876-023-02800-9>.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, [N.p.], vol. 196, n° 2, p. 261–282, jul. 1987. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9).

GIAN, L. de'Angelis; LORENA, B.; CINZIA, A.; NICOLA, de'Angelis; GIOACCHINO, L.; FRANCESCO, D. M.; FEDERICA, G.; FRANCESCA, N. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Acta Bio Medica : Atenei Parmensis**, [N.p.], vol. 89, n° Suppl 9, p. 97–101, 2018. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i9-S.7960>.

GILLESSEN, S.; CARVAJAL, D.; LING, P.; PODLASKI, F. J.; STREMLLO, D. L.; FAMILLETTI, P. C.; GUBLER, U.; PRESKY, D. H.; STERN, A. S.; GATELY, M. K. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. **European Journal of Immunology**, [N.p.], vol. 25, n° 1, p. 200–206, jan. 1995. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250133>.

GOKUL, G.; KHOSLA, S. DNA methylation and cancer. **Sub-Cellular Biochemistry**, [N.p.], vol. 61, p. 597–625, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_26.

GONZALEZ-GARZA, M. T.; CRUZ-VEGA, D. E.; MALDONADO-BERNAL, C.; GONZALEZ-GARZA, M. T.; CRUZ-VEGA, D. E.; MALDONADO-BERNAL, C. IL10 as Cancer Biomarker. **Translational Research in Cancer**. [N.p.]: IntechOpen, 8 jun. 2020. DOI: 10.5772/intechopen.90806. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/70795>. Acesso em: 17 jan. 2024.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences. **Immunity**, [N.p.], vol. 51, n° 1, p. 27–41, 16 jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.

GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. **Seminars in immunopathology**, [N.p.], vol. 35, n° 2, p. 229–244, mar. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0352-6>.

GRIVENNIKOV, S. I.; WANG, K.; MUCIDA, D.; STEWART, C. A.; SCHNABL, B.; JAUCH, D.; TANIGUCHI, K.; YU, G.-Y.; OSTERREICHER, C. H.; HUNG, K. E.; DATZ, C.; FENG, Y.; FEARON, E. R.; OUKKA, M.; TESSAROLLO, L.; COPPOLA, V.; YAROVINSKY, F.; CHEROUTRE, H.; ECKMANN, L.; TRINCHIERI, G.; KARIN, M. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. **Nature**, [N.p.], vol. 491, n° 7423, p. 254–258, 8 nov. 2012. <https://doi.org/10.1038/nature11465>.

GUINNEY, J.; DIENSTMANN, R.; WANG, X.; DE REYNIÈS, A.; SCHLICKER, A.; SONESON, C.; MARISA, L.; ROEPMAN, P.; NYAMUNDANDA, G.; ANGELINO, P.; BOT, B. M.; MORRIS, J. S.; SIMON, I. M.; GERSTER, S.; FESSLER, E.; DE SOUSA E MELO, F.; MISSIAGLIA, E.; RAMAY, H.; BARRAS, D.; HOMICKO, K.; MARU, D.; MANYAM, G. C.; BROOM, B.; BOIGE, V.; PEREZ-VILLAMIL, B.; LADERAS, T.; SALAZAR, R.; GRAY, J. W.; HANAHAN, D.; TABERNERO, J.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H.; LAURENT-PUIG, P.; MEDEMA, J. P.; SADANANDAM, A.; WESSELS, L.; DELORENZI, M.; KOPETZ, S.; VERMEULEN, L.; TEJPAR, S. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. **Nature medicine**, [N.p.], vol. 21, n° 11, p. 1350–1356, nov. 2015. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [N.p.], vol. 12, nº 1, p. 31–46, jan. 2022. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [N.p.], vol. 144, nº 5, p. 646–674, 4 mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HARADA, S.; MORLOTE, D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, [N.p.], vol. 27, nº 1, p. 20, jan. 2020. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000247>.

HARALDSDÓTTIR, S.; HÁLF DANARSON, Þ. R. Krabbamein í ristli og endaparmi. **Krabbamein í ristli og endaparmi**, [N.p.], vol. 100, nº 2, p. 75–82, fev. 2014. <https://doi.org/10.17992/ibl.2014.02.531>.

HUANG, X.; QIN, S.; LIU, Y.; TAO, L.; JIANG, H. Associations of tumor necrosis factor- α polymorphisms with the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. **Bioscience Reports**, [N.p.], vol. 39, nº 1, p. BSR20181750, 31 jan. 2019. <https://doi.org/10.1042/BSR20181750>.

IARC. 2024. **Cancer and Alcohol**. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/causes/alcohol/home>. Acesso em: 28 jan. 2024.

IBRAHIM, A. E. K.; ARENDS, M. J.; SILVA, A.-L.; WYLLIE, A. H.; GREGER, L.; ITO, Y.; VOWLER, S. L.; HUANG, T. H.-M.; TAVARE, S.; MURRELL, A.; BRENTON, J. D. Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression. **Gut**, [N.p.], vol. 60, nº 4, p. 499–508, 1 abr. 2011. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223602>.

ILLINGWORTH, R. S.; BIRD, A. P. CpG islands – ‘A rough guide’. **FEBS Letters**, [N.p.], vol. 583, nº 11, p. 1713–1720, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>.

INCA. **Deteção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: [N.p.], [S.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/intestino/versao-para-profissionais-de-saude>. Acesso em: 25 fev. 2024.

INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional De Câncer, 31 mar. 2023. 160 p.

IONESCU, V. A.; GHEORGHE, G.; BACALBASA, N.; CHIOTOROIU, A. L.; DIACONU, C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. **Medicina**, [N.p.], vol. 59, nº 9, p. 1646, 12 set. 2023. <https://doi.org/10.3390/medicina59091646>.

ISSA IA; NOUREDDINE M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. **World Journal of Gastroenterology**, [N.p.], vol. 23, nº 28, p. 5086–5096, 28 jul. 2017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i28.5086>.

ISSA, J.-P. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nat Rev Câncer**, [N.p.], vol. 4, nº 12, p. 988–993, dez. 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1507>.

JIA, M.; GAO, X.; ZHANG, Y.; HOFFMEISTER, M.; BRENNER, H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic

review. **Clinical Epigenetics**, [N.p.], vol. 8, n° 1, p. 25, dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0191-8>.

JIANKUN LIU; YUZHONG DUAN; XIAOMING CHENG; XI CHEN; WEI XIE; HAIXIA LONG; ZHIHUA LIN; BO ZHU. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [N.p.], vol. 407, n° 2, p. 348–354, 8 abr. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.021>.

JIN, Z.; LIU, Y. DNA methylation in human diseases. **Genes & Diseases**, [N.p.], vol. 5, n° 1, p. 1–8, 31 jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.01.002>.

JOHDI, N. A.; MAZLAN, L.; SAGAP, I.; JAMAL, R. Profiling of cytokines, chemokines and other soluble proteins as a potential biomarker in colorectal cancer and polyps. **Cytokine**, [N.p.], vol. 99, p. 35–42, nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.015>.

JOHDI, N. A.; SUKOR, N. F. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. **Frontiers in Immunology**, [N.p.], vol. 11, p. 1624, 18 set. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01624>.

JORGOVANOVIC, D.; SONG, M.; WANG, L.; ZHANG, Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research**, [N.p.], vol. 8, n° 1, p. 49, 29 set. 2020. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>.

KALER, P.; AUGENLICHT, L.; KLAMPFER, L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. **Oncogene**, [N.p.], vol. 28, n° 44, p. 3892–3902, 5 nov. 2009. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.247>.

KAMINSKA, J.; NOWACKI, M. P.; KOWALSKA, M.; RYSINSKA, A.; CHWALINSKI, M.; FUKSIEWICZ, M.; MICHALSKI, W.; CHECHLINSKA, M. Clinical Significance of Serum Cytokine Measurements in Untreated Colorectal Cancer Patients: Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Type I – An Independent Prognostic Factor. **Tumor Biology**, [N.p.], vol. 26, n° 4, p. 186–194, 2005. <https://doi.org/10.1159/000086951>.

KANG, X.-C.; CHEN, M.; YANG, F.; GAO, B.; YANG, Q.; ZHENG, W.; HAO, S. Promoter methylation and expression of SOCS-1 affect clinical outcome and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [N.p.], vol. 80, p. 23–29, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.011>.

KANTOLA, T.; KLINTRUP, K.; VÄYRYNEN, J. P.; VORNANEN, J.; BLOIGU, R.; KARHU, T.; HERZIG, K.-H.; NÄPÄNKANGAS, J.; MÄKELÄ, J.; KARTTUNEN, T. J.; TUOMISTO, A.; MÄKINEN, M. J. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. **British Journal of Cancer**, [N.p.], vol. 107, n° 10, p. 1729–1736, 6 nov. 2012. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.456>.

KASPRZAK, A. The Role of Tumor Microenvironment Cells in Colorectal Cancer (CRC) Cachexia. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 22, n° 4, p. 1565, 4 fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22041565>.

KLUTSTEIN, M.; NEJMAN, D.; GREENFIELD, R.; CEDAR, H. DNA Methylation in Cancer and Aging. **Cancer Research**, [N.p.], vol. 76, n° 12, p. 3446–3450, 15 jun. 2016. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3278>.

KNÜPFER, H.; PREISS, R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. **International Journal of Colorectal Disease**, [N.p.], vol. 25, n° 2, p. 135–140, fev. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0818-8>.

KOBELT, D.; ZHANG, C.; CLAYTON-LUCEY, I. A.; GLAUBEN, R.; VOSS, C.; SIEGMUND, B.; STEIN, U. Pro-inflammatory TNF- α and IFN- γ Promote Tumor Growth and Metastasis via Induction of MACC1. **Frontiers in Immunology**, [N.p.], vol. 11, p. 980, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00980>.

KOJIMA, K.; NAKAMURA, T.; OHBU, M.; KATOH, H.; OOIZUMI, Y.; IGARASHI, K.; ISHII, S.; TANAKA, T.; YOKOI, K.; NISHIZAWA, N.; YOKOTA, K.; KOSAKA, Y.; SATO, T.; WATANABE, M.; YAMASHITA, K. Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1) gene promoter methylation during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. **PLoS ONE**, [N.p.], vol. 13, n° 5, p. e0194785, 10 maio 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194785>.

KOLLER, F. L.; HWANG, D. G.; DOZIER, E. A.; FINGLETON, B. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. **Carcinogenesis**, [N.p.], vol. 31, n° 6, p. 1010–1017, jun. 2010. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq044>.

KUIPERS, E. J.; GRADY, W. M.; LIEBERMAN, D.; SEUFFERLEIN, T.; SUNG, J. J.; BOELEN, P. G.; VAN DE VELDE, C. J. H.; WATANABE, T. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [N.p.], vol. 1, n° 1, p. 15065, 17 dez. 2015. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>.

KUIPERS, E. J.; RÖSCH, T.; BRETTHAUER, M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, [N.p.], vol. 10, n° 3, p. 130–142, mar. 2013. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.12>.

LAO, V. V.; GRADY, W. M. Epigenetics and colorectal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [N.p.], vol. 8, n° 12, p. 686–700, dez. 2011. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.

LI, B.; WANG, F.; MA, C.; HAO, T.; GENG, L.; JIANG, H. Predictive value of IL-18 and IL-10 in the prognosis of patients with colorectal cancer. **Oncology Letters**, [N.p.], vol. 18, n° 1, p. 713–719, jul. 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10338>.

LI, H.; WANG, Z.; ZHAO, G.; MA, Y.; CHEN, Y.; XUE, Q.; ZHENG, M.; FEI, S. Performance of a MethyLight assay for methylated SFRP2 DNA detection in colorectal cancer tissue and serum. **The International Journal of Biological Markers**, [N.p.], vol. 34, n° 1, p. 54–59, mar. 2019. <https://doi.org/10.1177/1724600818820536>.

LI, J.; SU, X.; DAI, L.; CHEN, N.; FANG, C.; DONG, Z.; FU, J.; YU, Y.; WANG, W.; ZHANG, H.; WANG, H.; JI, Y.; LIU, Y.; CHENG, L.; SHI, G.; ZHANG, S.; YANG, Y.; DENG, H. Corrigendum to: Temporal DNA methylation pattern and targeted therapy in colitis-associated cancer. **Carcinogenesis**, [N.p.], vol. 41, n° 2, p. 248, 22 abr. 2020. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa004>.

LI, X.; YAO, X.; WANG, Y.; HU, F.; WANG, F.; JIANG, L.; LIU, Y.; WANG, D.; SUN, G.; ZHAO, Y. MLH1 Promoter Methylation Frequency in Colorectal Cancer Patients and Related Clinicopathological and Molecular Features. **PLoS ONE**, [N.p.], vol. 8, n° 3, p. e59064, 29 mar. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059064>.

LIAO, W.; LIN, J.-X.; LEONARD, W. J. IL-2 Family Cytokines: New Insights into the Complex Roles of IL-2 as a Broad Regulator of T helper Cell Differentiation. **Current Opinion in Immunology**, [N.p.], vol. 23, n° 5, p. 598–604, out. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.003>.

LIND, G. E.; KLEIVI, K.; MELING, G. I.; TEIXEIRA, M. R.; THIS-EVENSEN, E.; ROGNUM, T. O.; LOTHE, R. A. *ADAMTS1*, *CRABP1*, and *NR3C1* Identified as Epigenetically Deregulated Genes in Colorectal Tumorigenesis. **Analytical Cellular Pathology**, [N.p.], vol. 28, n° 5–6, p. 259–272, 1 jan. 2006. <https://doi.org/10.1155/2006/949506>.

LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **The Lancet. Oncology**, [N.p.], vol. 14, n° 6, p. e218–228, maio 2013. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70582-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70582-X).

LIU, C.; LIU, R.; WANG, B.; LIAN, J.; YAO, Y.; SUN, H.; ZHANG, C.; FANG, L.; GUAN, X.; SHI, J.; HAN, S.; ZHAN, F.; LUO, S.; YAO, Y.; ZHENG, T.; ZHANG, Y. Blocking IL-17A enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy in microsatellite stable colorectal cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, [N.p.], vol. 9, n° 1, p. e001895, 17 jan. 2021. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001895>.

LIU, L.; NISHIHARA, R.; QIAN, Z. R.; TABUNG, F. K.; NEVO, D.; ZHANG, X.; SONG, M.; CAO, Y.; MIMA, K.; MASUGI, Y.; SHI, Y.; DA SILVA, A.; TWOMBLY, T.; GU, M.; LI, W.; HAMADA, T.; KOSUMI, K.; INAMURA, K.; NOWAK, J. A.; DREW, D. A.; LOCHHEAD, P.; NOSHO, K.; WU, K.; WANG, M.; GARRETT, W. S.; CHAN, A. T.; FUCHS, C. S.; GIOVANNUCCI, E. L.; OGINO, S. Association Between Inflammatory Diet Pattern and Risk of Colorectal Carcinoma Subtypes Classified by Immune Responses to Tumor. **Gastroenterology**, [N.p.], vol. 153, n° 6, p. 1517–1530.e14, dez. 2017. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.045>.

LIU YU; LIAO JIEYUE; LU QIANJIN. Laboratory Methods in Epigenetics. **Epigenetics and Dermatology**. [N.p.]: Elsevier, 2015. p. 7–35. DOI: 10.1016/B978-0-12-800957-4.00002-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009574000023>. Acesso em: 28 fev. 2024.

LOTEM, J.; LEVANON, D.; NEGREANU, V.; LESHKOWITZ, D.; FRIEDLANDER, G.; GRONER, Y. Runx3-mediated Transcriptional Program in Cytotoxic Lymphocytes. **PLoS ONE**, [N.p.], vol. 8, n° 11, p. e80467, 13 nov. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080467>.

MAIURI, A. R.; O'HAGAN, H. M. Interplay Between Inflammation and Epigenetic Changes in Cancer. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [N.p.]: Elsevier, 2016. vol. 144, p. 69–117. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117316300606>. Acesso em: 25 jan. 2024.

MALEK, T. R.; CASTRO, I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. **Immunity**, [N.p.], vol. 33, n° 2, p. 153–165, 27 ago. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.004>.

MARZOUK, O.; SCHOFIELD, J. Review of Histopathological and Molecular Prognostic Features in Colorectal Cancer. **Cancers**, [N.p.], vol. 3, n° 2, p. 2767–2810, 23 jun. 2011. <https://doi.org/10.3390/cancers3022767>.

MAUGERI, A.; BARCHITTA, M.; MAGNANO SAN LIO, R.; LI DESTRI, G.; AGODI, A.; BASILE, G. Epigenetic Aging and Colorectal Cancer: State of the Art and Perspectives for Future Research. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 22, n° 1, p. 200, 28 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms22010200>.

MCNABB, S.; HARRISON, T. A.; ALBANES, D.; BERNDT, S. I.; BRENNER, H.; CAAN, B. J.; CAMPBELL, P. T.; CAO, Y.; CHANG-CLAUDE, J.; CHAN, A.; CHEN, Z.; ENGLISH, D. R.; GILES, G. G.; GIOVANNUCCI, E. L.; GOODMAN, P. J.; HAYES, R. B.; HOFFMEISTER, M.; JACOBS, E. J.; JOSHI, AmitD.; LARSSON, S. C.; LE MARCHAND, L.; LI, L.; LIN, Y.; MÄNNISTÖ, S.; MILNE, R. L.; NAN, H.; NEWTON, C. C.; OGINO, S.; PARFREY, P. S.; PETERSEN, P. S.; POTTER, J. D.; SCHOEN, R. E.; SLATTERY, M. L.; SU, Y.-R.; TANGEN, C. M.; TUCKER, T. C.; WEINSTEIN, S. J.; WHITE, E.; WOLK, A.; WOODS, M. O.; PHIPPS, A. I.; PETERS, U. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. **International journal of cancer**, [N.p.], vol. 146, n° 3, p. 861–873, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1002/ijc.32377>.

MITEVA, L. D.; STANILOV, N. S.; DELIYSKY, T. S.; STANILOVA, S. A. Significance of -1082A/G polymorphism of IL10 gene for progression of colorectal cancer and IL-10 expression. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, [N.p.], vol. 35, n° 12, p. 12655–12664, dez. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2589-2>.

MU, W.-P.; WANG, J.; NIU, Q.; SHI, N.; LIAN, H.-F. Clinical significance and association of RUNX3 hypermethylation frequency with colorectal cancer: a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, [N.p.], vol. 7, p. 1237–1245, 2014. <https://doi.org/10.2147/OTT.S62103>.

MÜLLER, M. F.; IBRAHIM, A. E. K.; ARENDS, M. J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, [N.p.], vol. 469, n° 2, p. 125–134, ago. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>.

MUNKHOLM, P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [N.p.], vol. 18 Suppl 2, p. 1–5, set. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x>.

NCCN. **Guidelines for Patients: Rastreo de câncer colorretal**, [N.p.], n° Versão 2, 13 abr. 2021. Disponível em: <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/colorectal-screening-PT-Br-patient.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2022.

NGUYEN, L. H.; GOEL, A.; CHUNG, D. C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. **Gastroenterology**, [N.p.], vol. 158, n° 2, p. 291–302, jan. 2020. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>.

NISHIO, M.; SAKAKURA, C.; NAGATA, T.; KOMIYAMA, S.; MIYASHITA, A.; HAMADA, T.; KURYU, Y.; IKOMA, H.; KUBOTA, T.; KIMURA, A.; NAKANISHI, M.; ICHIKAWA, D.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, K.; OCHIAI, T.; KOKUBA, Y.; SONOYAMA, T.; IDA, H.; ITO, K.; CHIBA, T.; ITO, Y.; OTSUJI, E. RUNX3 Promoter Methylation in Colorectal Cancer: Its Relationship with Microsatellite Instability and its Suitability as a Novel Serum Tumor Marker. **ANTICANCER RESEARCH**, [N.p.], 2010.

OGINO, S. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. **Gut**, [N.p.], vol. 55, n° 7, p. 1000–1006, 16 fev. 2006. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082933>.

OGINO, S.; CANTOR, M.; KAWASAKI, T.; BRAHMANDAM M.; KIRKNER, G J; WEISENBERGER, D J; CAMPAN, P; LAIRD, P W; LODA, M; FUCHS, C S. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. **Gut**, [N.p.], vol. 55, n° 7, p. 1000–1006, 16 fev. 2006. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082933>.

OGINO, S; NOSHO, K; KIRKNER, GJ; KAWASAKI, T; MEYERHARDT JA; LODA, M; GIOVANNUCCI, EL; FUCHS, CS. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. **Gut**, [N.p.], vol. 58, n° 1, p. 90–96, jan. 2009. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.155473>.

O'HARA, R. J.; GREENMAN, J.; MACDONALD, A. W.; GASKELL, K. M.; TOPPING, K. P.; DUTHIE, G. S.; KERIN, M. J.; LEE, P. W.; MONSON, J. R. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, [N.p.], vol. 4, n° 8, p. 1943–1948, ago. 1998.

OLKHOV-MITSEL, E.; VAN DER KWAST, T.; KRON, K.; OZCELIK, H.; BRIOLLAIS, L.; MASSAEY, C.; RECKER, F.; KWIATKOWSKI, M.; FLESHNER, N.; DIAMANDIS, E.; ZLOTTA, A.; BAPAT, B. Quantitative DNA methylation analysis of genes coding for kallikrein-related peptidases 6 and 10 as biomarkers for prostate cancer. **Epigenetics**, [N.p.], vol. 7, n° 9, p. 1037–1045, 7 set. 2012. <https://doi.org/10.4161/epi.21524>.

ORDÓÑEZ-MENA, J. M.; WALTER, V.; SCHÖTTKER, B.; JENAB, M.; O'DOHERTY, M. G.; KEE, F.; BUENO-DE-MESQUITA, B.; PEETERS, P. H. M.; STRICKER, B. H.; RUITER, R.; HOFMAN, A.; SÖDERBERG, S.; JOUSILAHTI, P.; KUULASMAA, K.; FREEDMAN, N. D.; WILSGAARD, T.; WOLK, A.; NILSSON, L. M.; TJØNNELAND, A.; QUIRÓS, J. R.; VAN DUINHOFEN, F. J. B.; SIERSEMA, P. D.; BOFFETTA, P.; TRICHOPOULOU, A.; BRENNER, H. Impact of prediagnostic smoking and smoking cessation on colorectal cancer prognosis: a meta-analysis of individual patient data from cohorts within the CHANCES consortium. **Annals of Oncology**, [N.p.], vol. 29, n° 2, p. 472–483, fev. 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx761>.

OTERO-ESTÉVEZ, O.; GALLARDO-GOMEZ, M.; CADENA, M. P. de la; RODRÍGUEZ-BERROCAL, F. J.; CUBIELLA, J.; RAMIREZ, V. H.; GARCÍA-NIMO, L.; CHIARA, L. D. Value of Serum NEUROG1 Methylation for the Detection of Advanced Adenomas and Colorectal Cancer. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, [N.p.], vol. 10, n° 7, p. 437, 28 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10070437>.

PACHECO-PÉREZ, L. A.; RUÍZ-GONZÁLEZ, K. J.; DE-LA-TORRE-GÓMEZ, A. C. G.; GUEVARA-VALTIER, M. C.; RODRÍGUEZ-PUENTE, L. A.; GUTIÉRREZ-VALVERDE, J. M. Environmental factors and awareness of colorectal cancer in people at familial risk *. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [N.p.], vol. 27, p. e3195, 14 out. 2019. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.3082.3195>.

PĄCZEK, S.; ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC, M.; GRYKO, M.; MROCZKO, P.; KULCZYŃSKA-PRZYBIK, A.; MROCZKO, B. CXCL-8 in Preoperative Colorectal Cancer Patients: Significance for Diagnosis and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 21, n° 6, p. 2040, 17 mar. 2020a. <https://doi.org/10.3390/ijms21062040>.

PĄCZEK, S.; ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC, M.; GRYKO, M.; MROCZKO, P.; KULCZYŃSKA-PRZYBIK, A.; MROCZKO, B. CXCL-8 in Preoperative Colorectal Cancer Patients: Significance for Diagnosis and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 21, n° 6, p. 2040, 17 mar. 2020b. <https://doi.org/10.3390/ijms21062040>.

PÉREZ, R. F.; TEJEDOR, J. R.; BAYÓN, G. F.; FERNÁNDEZ, A. F.; FRAGA, M. F. Distinct chromatin signatures of DNA hypomethylation in aging and cancer. **Aging Cell**, [N.p.], vol. 17, n° 3, p. e12744, jun. 2018. <https://doi.org/10.1111/accel.12744>.

RASMUSSEN, S.; LARSEN, P. V.; SØNDERGAARD, J.; ELNEGAARD, S.; SVENDSEN, R. P.; JARBØL, D. E. Specific and non-specific symptoms of colorectal cancer and contact to general practice. **Family Practice**, [N.p.], vol. 32, n° 4, p. 387–394, ago. 2015. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmz032>.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Przegląd Gastroenterologiczny**, [N.p.], vol. 14, n° 2, p. 89–103, 2019. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.

REIK, W.; LEWIS, A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. **Nature Reviews Genetics**, [N.p.], vol. 6, n° 5, p. 403–410, maio 2005. <https://doi.org/10.1038/nrg1602>.

REINERT, T.; BORRE, M.; CHRISTIANSEN, A.; HERMANN, G. G.; ØRNTØFT, T. F.; DYRSKJØT, L. Diagnosis of Bladder Cancer Recurrence Based on Urinary Levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 Hypermethylation. **PLOS ONE**, [N.p.], vol. 7, n° 10, p. e46297, 3 out. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046297>.

SAWICKI, T.; RUSZKOWSKA, M.; DANIELEWICZ, A.; NIEDŹWIEDZKA, E.; ARŁUKOWICZ, T.; PRZYBYŁOWICZ, K. E. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. **Cancers**, [N.p.], vol. 13, n° 9, p. 2025, 22 abr. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>.

SCHALPER, K. A.; CARLETON, M.; ZHOU, M.; CHEN, T.; FENG, Y.; HUANG, S.-P.; WALSH, A. M.; BAXI, V.; PANDYA, D.; BARADET, T.; LOCKE, D.; WU, Q.; REILLY, T. P.; PHILLIPS, P.; NAGINENI, V.; GIANINO, N.; GU, J.; ZHAO, H.; PEREZ-GRACIA, J. L.; SANMAMED, M. F.; MELERO, I. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors.

Nature Medicine, [N.p.], vol. 26, n° 5, p. 688–692, 5, maio 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0856-x>.

SCHMITT, M.; GRETEN, F. R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. **Nature Reviews Immunology**, [N.p.], vol. 21, n° 10, p. 653–667, out. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00534-x>.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, [N.p.], vol. 96, p. 41–101, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96002-2).

SHIMA, K.; NOSHO, K.; BABA, Y.; CANTOR, M.; MEYERHARDT, J. A.; GIOVANNUCCI, E. L.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. **International Journal of Cancer**, [N.p.], vol. 128, n° 5, p. 1080–1094, 2011a. <https://doi.org/10.1002/ijc.25432>.

SHIMA, K.; NOSHO, K.; BABA, Y.; CANTOR, M.; MEYERHARDT, J. A.; GIOVANNUCCI, E. L.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. Prognostic Significance of CDKN2A (p16) Promoter Methylation and Loss of Expression in 902 Colorectal Cancers: Cohort Study and Literature Review. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, [N.p.], vol. 128, n° 5, p. 1080–1094, 1 mar. 2011b. <https://doi.org/10.1002/ijc.25432>.

SHIN, E. J.; KIM, H. J.; SON, M. W.; AHN, T. S.; LEE, H. Y.; LIM, D. R.; BAE, S. B.; JEON, S.; KIM, H.; JEONG, D.; LEE, M. S.; KIM, D.-S.; NOH, J. S.; BAEK, M.-J. Epigenetic inactivation of RUNX3 in colorectal cancer. **Annals of Surgical Treatment and Research**, [N.p.], vol. 94, n° 1, p. 19–25, jan. 2018. <https://doi.org/10.4174/ast.2018.94.1.19>.

SILVA, F. C. C. D.; VALENTIN, M. D.; FERREIRA, F. D. O.; CARRARO, D. M.; ROSSI, B. M. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Medical Journal**, [N.p.], vol. 127, n° 1, p. 46–51, jan. 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802009000100010>.

SINGH, A.; GUPTA, S.; BADARUKHIYA, J. A.; SACHAN, M. Detection of aberrant methylation of HOXA9 and HIC1 through multiplex MethyLight assay in serum DNA for the early detection of epithelial ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, [N.p.], vol. 147, n° 6, p. 1740–1752, 2020. <https://doi.org/10.1002/ijc.32984>.

SONG, X.; QIAN, Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. **Cytokine**, [N.p.], vol. 62, n° 2, p. 175–182, maio 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.014>.

STEWART, S. L.; WIKE, J. M.; KATO, I.; LEWIS, D. R.; MICHAUD, F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998–2001. **Cancer**, [N.p.], vol. 107, n° S5, p. 1128–1141, 2006. <https://doi.org/10.1002/cncr.22010>.

SUN, H.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; LIU, Y. Insulin-like growth factor 2 hypermethylation in peripheral blood leukocytes and colorectal cancer risk and prognosis: a propensity score analysis. **Frontiers in Oncology**, [N.p.], vol. 13, p. 971435, 5 maio 2023. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.971435>.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [N.p.], vol. 71, n° 3, p. 209–249, maio 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

THANIKACHALAM, K.; KHAN, G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**, [N.p.], vol. 11, n° 1, p. 164, 14 jan. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>.

TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; FREDRIKSEN, T.; MAUGER, S.; BINDEA, G.; BERGER, A.; BRUNEVAL, P.; FRIDMAN, W.-H.; PAGES, F.; GALON, J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. **Cancer Research**, [N.p.], vol. 71, n° 4, p. 1263–1271, 15 fev. 2011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>.

TOYOTA, M.; AHUJA, N.; OHE-TOYOTA, M.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B.; ISSA, J.-P. J. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [N.p.], vol. 96, n° 15, p. 8681–8686, jul. 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8681>.

TRAN, B.; KOPETZ, S.; TIE, J.; GIBBS, P.; JIANG, Z.-Q.; LIEU, C. H.; AGARWAL, A.; MARU, D. M.; SIEBER, O.; DESAI, J. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. **Cancer**, [N.p.], vol. 117, n° 20, p. 4623–4632, 15 out. 2011. <https://doi.org/10.1002/cncr.26086>.

VANDENBROUCKE, J. P.; VON ELM, E.; ALTMAN, D. G.; GÖTZSCHE, P. C.; MULROW, C. D.; POCKOCK, S. J.; POOLE, C.; SCHLESSELMAN, J. J.; EGGER, M. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): Explanation and Elaboration. **Epidemiology**, [N.p.], vol. 18, n° 6, p. 805–835, nov. 2007. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181577511>.

VARMA, T. K.; TOLIVER-KINSKY, T. E.; LIN, C. Y.; KOUTROUVELIS, A. P.; NICHOLS, J. E.; SHERWOOD, E. R. Cellular Mechanisms That Cause Suppressed Gamma Interferon Secretion in Endotoxin-Tolerant Mice. **Infection and Immunity**, [N.p.], vol. 69, n° 9, p. 5249–5263, set. 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5249-5263.2001>.

WANG, S.; WU, W. DNA Methylation Alterations in Human Cancers. **Epigenetics in Human Disease**. [N.p.]: Elsevier, 2018. p. 109–139. DOI: 10.1016/B978-0-12-812215-0.00005-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128122150000054>. Acesso em: 28 fev. 2024.

WEI, H.-X.; WANG, B.; LI, B. IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology. **Frontiers in Immunology**, [N.p.], vol. 11, p. 1315, 26 jun. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01315>.

WEISENBERGER, D. J.; SIEGMUND, K. D.; CAMPAN, M.; YOUNG, J.; LONG, T. I.; FAASSE, M. A.; KANG, G. H.; WIDSCHWENDTER, M.; WEENER, D.; BUCHANAN, D.; KOH, H.; SIMMS, L.; BARKER, M.; LEGGETT, B.; LEVINE, J.; KIM, M.; FRENCH, A. J.; THIBODEAU, S. N.; JASS, J.; HAILE, R.; LAIRD, P. W. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF

mutation in colorectal cancer. **Nature Genetics**, [N.p.], vol. 38, n° 7, p. 787–793, jul. 2006. <https://doi.org/10.1038/ng1834>.

WEN-JUN JIN; JIN-MING XU; WEN-LI XU; DONG-HUA GU; PEI-WEI LI. Diagnostic value of interleukin-8 in colorectal cancer: A case-control study and meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, [N.p.], vol. 20, n° 43, p. 16334, 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16334>.

WHIFFIN, N.; HOSKING, F. J.; FARRINGTON, S. M.; PALLES, C.; DOBBINS, S. E.; ZGAGA, L.; LLOYD, A.; KINNERSLEY, B.; GORMAN, M.; TENESA, A.; BRODERICK, P.; WANG, Y.; BARCLAY, E.; HAYWARD, C.; MARTIN, L.; BUCHANAN, D. D.; WIN, A. K.; HOPPER, J.; JENKINS, M.; LINDOR, N. M.; NEWCOMB, P. A.; GALLINGER, S.; CONTI, D.; SCHUMACHER, F.; CASEY, G.; LIU, T.; CAMPBELL, H.; LINDBLOM, A.; HOULSTON, R. S.; TOMLINSON, I. P.; DUNLOP, M. G. Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. **Human Molecular Genetics**, [N.p.], vol. 23, n° 17, p. 4729–4737, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu177>.

WONG, K.; XIE, G. Updates on the Molecular Genetics of Colorectal Cancer. **Colorectal Cancer: Open Access**, [N.p.], vol. 03, n° 01, 2017. DOI: 10.21767/2471-9943.100032. Disponível em: <http://colorectal-cancer.imedpub.com/updates-on-the-molecular-genetics-ofcolorectal-cancer.php?aid=19386>. Acesso em: 7 jan. 2023.

XU, J.; YE, Y.; ZHANG, H.; SZMITKOWSKI, M.; MÄKINEN, M.; LI, P.; XIA, D.; YANG, J.; WU, Y.; WU, H. Diagnostic and Prognostic Value of Serum Interleukin-6 in Colorectal Cancer. **Medicine**, [N.p.], vol. 95, n° 2, p. e2502, 15 jan. 2016. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002502>.

YAKOV KRELIN; ELENA VORONOV; SHAHAR DOTAN; MOSHE ELKABETS; ELI REICH; MINA FOGEL; MONIKA HUSZAR; YOICHIRO IWAKURA; SHRAGA SEGAL; CARLOS A DINARELLO; RONY N APTE. Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. **Cancer Research**, [N.p.], vol. 67, n° 3, p. 1062–1071, 1 fev. 2007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2956>.

YAU, T. O. Precision treatment in colorectal cancer: Now and the future. **JGH Open: An Open Access Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [N.p.], vol. 3, n° 5, p. 361–369, 8 fev. 2019. <https://doi.org/10.1002/jgh3.12153>.

ZHANG, W.; BORCHERDING, N.; KOLB, R. IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [N.p.], vol. 1240, p. 1–23, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_1.

ZHENG, J.; WANG, X.; YU, J.; ZHAN, Z.; GUO, Z. IL-6, TNF- α and IL-12p70 levels in patients with colorectal cancer and their predictive value in anti-vascular therapy. **Frontiers in Oncology**, [N.p.], vol. 12, p. 997665, 26 set. 2022a. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.997665>.

ZHENG, J.; WANG, X.; YU, J.; ZHAN, Z.; GUO, Z. IL-6, TNF- α and IL-12p70 levels in patients with colorectal cancer and their predictive value in anti-vascular therapy. **Frontiers in Oncology**, [N.p.], vol. 12, p. 997665, 26 set. 2022b. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.997665>.

9 APÊNDICE

9.1 Curva ROC para metilação dos genes CDKN2A e RUNX

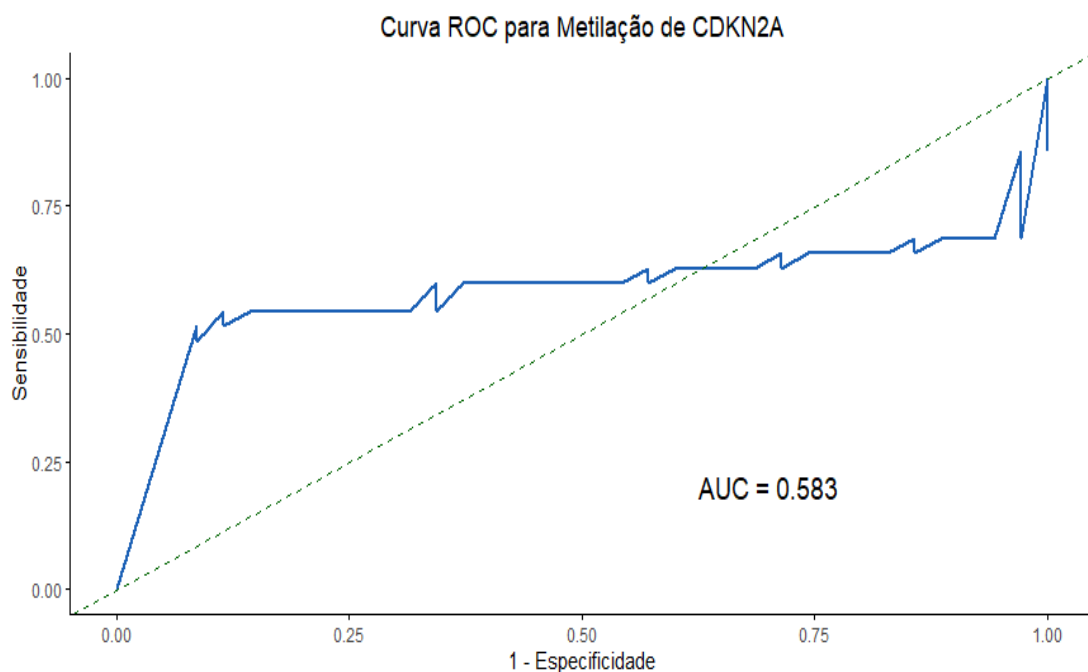


Figura 14. Curva ROC para a metilação do gene CDKN2A. A curva ilustra a sensibilidade versus a especificidade do teste, e a Área sob a Curva (AUC) de 0,583 indica a capacidade preditiva da metilação do gene em distinguir entre os grupos analisados no estudo.

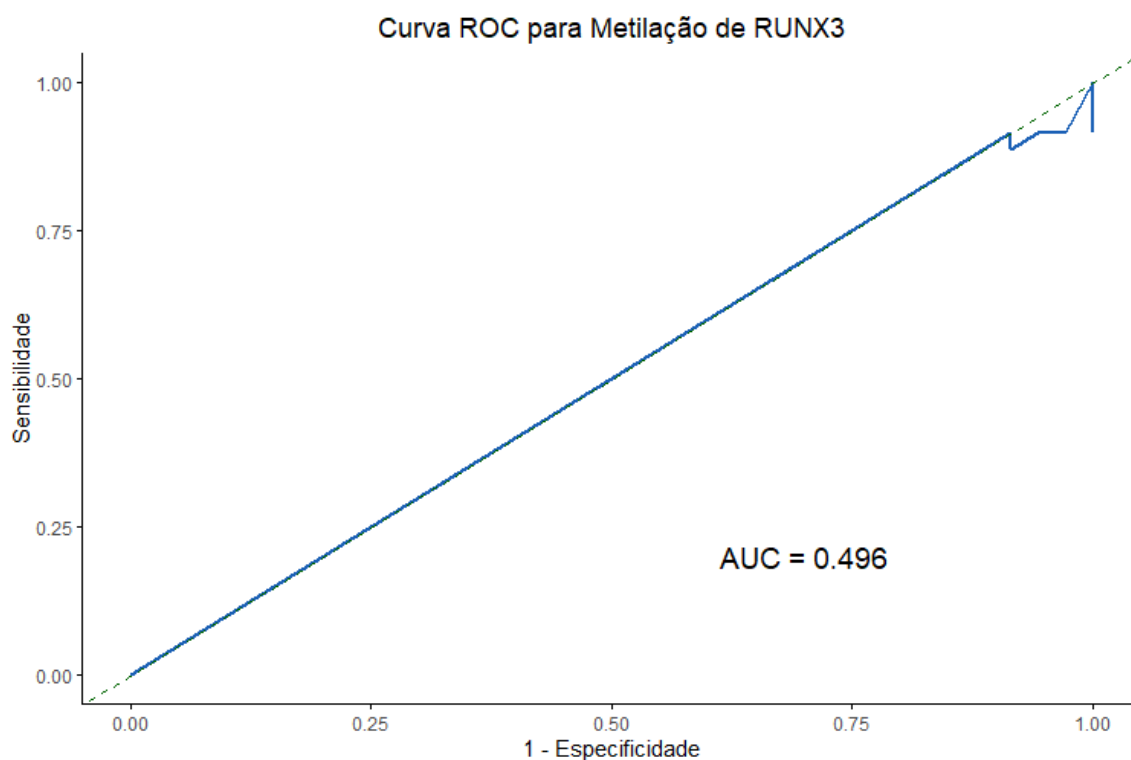


Figura 15. Curva ROC para a metilação do gene RUNX3. A curva ilustra a sensibilidade versus a especificidade do teste, e a Área sob a Curva (AUC) 0,496 onde indica que a metilação do gene não possui uma capacidade preditiva para diferenciar os grupos analisados no estudo.

9.2 Gráfico de teste RUNX3 com Jitter

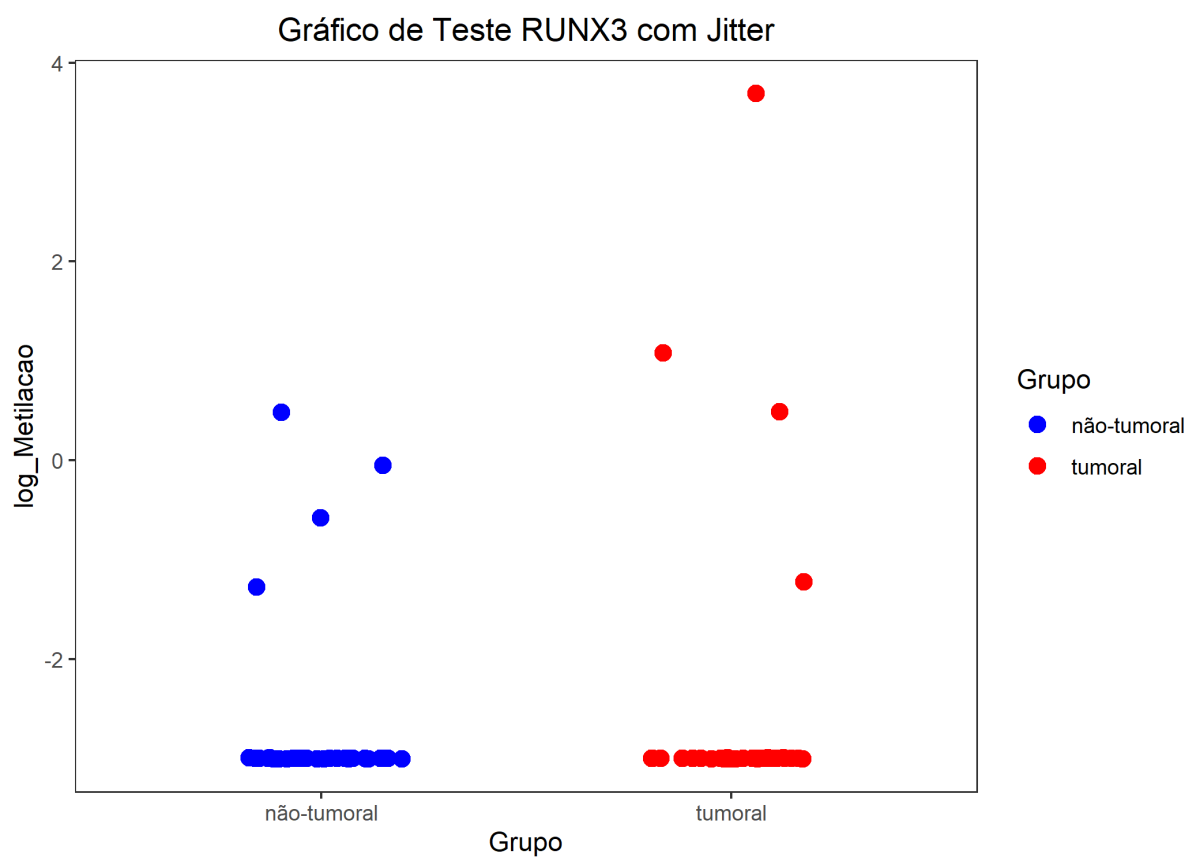


Figura 16. Níveis de metilação do gene RUNX3 entre grupos de pacientes. O gráfico de dispersão com jitter horizontal ilustra a distribuição dos níveis de metilação em uma escala logarítmica (log_Metilação) no tecido tumoral e não-tumoral. Cada ponto representa um paciente, e o jitter é usado para evitar a sobreposição de pontos com valores idênticos.

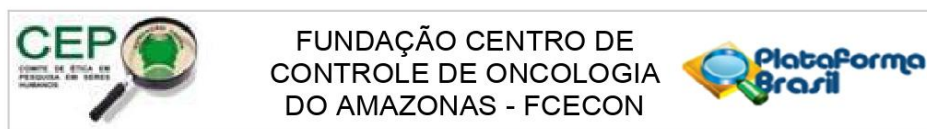
10 ANEXOS

10.1 Classificação em CIMP high ou low baseada nos CpGs presentes em ilhas de genes

D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
RUNX	MLH1	CDKN1	SOC3	CACNA	CRAB1	NEUR1	INS-IG	ACTB	CDO1				
0,509270	0,041286	0,065248	0,066453	0,245377	0,085157	0,326014	0,283767	0,038094	0,464920		AZUL	Hypometh (CIMPL)	< 0,3
0,331194	0,039782	0,068547	0,053520	0,247181	0,068967	0,071903	0,199964	0,036199	0,060798		ROSA	Hyper(CIMPH)	> 0,7
0,589784	0,032728	0,060156	0,062199	0,370627	0,063433	0,214093	0,316698	0,038294	0,369308		CINZA	HEMI	0,3 - 0,7
0,378562	0,039219	0,072878	0,057985	0,218471	0,062111	0,108910	0,276965	0,038832	0,217044				
0,516619	0,030854	0,070136	0,049083	0,386627	0,051800	0,227743	0,303791	0,031211	0,410467				
0,342555	0,032521	0,066057	0,052430	0,255810	0,056997	0,049460	0,149585	0,031395	0,040476				
0,593051	0,029018	0,056955	0,055595	0,377347	0,051965	0,083525	0,366397	0,030480	0,314253				
0,427819	0,021987	0,046469	0,034891	0,152029	0,069791	0,078870	0,224757	0,020467	0,130927				
0,616532	0,039641	0,076350	0,064536	0,252581	0,099017	0,215891	0,249136	0,043119	0,095259				
0,448089	0,039633	0,077485	0,067685	0,273752	0,081872	0,164383	0,289773	0,045214	0,256817				
0,497856	0,041109	0,064735	0,058036	0,405746	0,077741	0,131255	0,306999	0,044784	0,563114				
0,397348	0,040389	0,089936	0,068889	0,233369	0,089851	0,130094	0,261308	0,044110	0,228737				
0,459554	0,036607	0,065331	0,065160	0,297502	0,094467	0,178964	0,288208	0,042968	0,236909				
0,460781	0,040153	0,082721	0,059805	0,268335	0,118607	0,233312	0,286458	0,039043	0,157793				
0,669881	0,496232	0,529139	0,066323	0,517418	0,500487	0,543360	0,527544	0,041487	0,506113				
0,505392	0,047783	0,137434	0,212118	0,331531	0,106910	0,281656	0,325804	0,081969	0,301173				
0,619316	0,037299	0,075369	0,073906	0,200153	0,652179	0,105138	0,247497	0,043121	0,551866				
0,487669	0,041622	0,068292	0,068666	0,213953	0,098047	0,192383	0,295418	0,039217	0,177948				
0,615302	0,034170	0,082231	0,076867	0,390255	0,093208	0,100234	0,284574	0,041705	0,386147				
0,536685	0,036723	0,062513	0,076438	0,397145	0,173088	0,090427	0,275860	0,042807	0,470771				
0,550592	0,034240	0,141283	0,067409	0,305524	0,097928	0,169515	0,272650	0,041169	0,334717				
0,477630	0,036331	0,075526	0,062212	0,216447	0,123340	0,201681	0,278713	0,037194	0,202110				
0,546359	0,029585	0,061469	0,054062	0,445022	0,058702	0,284487	0,272733	0,027299	0,417882				
0,546232	0,026479	0,052331	0,036902	0,161725	0,048490	0,100847	0,207197	0,023750	0,067708				
0,548536	0,037957	0,073663	0,064085	0,296464	0,092209	0,159173	0,263529	0,043071	0,254215				
0,461965	0,036720	0,068407	0,062271	0,192281	0,076039	0,150903	0,258990	0,043792	0,119339				
0,577594	0,036627	0,055842	0,065748	0,178016	0,064877	0,412205	0,334048	0,046816	0,420197				
0,377258	0,037136	0,074235	0,068341	0,212198	0,061944	0,086212	0,229307	0,038338	0,050108				
0,607784	0,038489	0,058237	0,058133	0,436968	0,109329	0,239190	0,273695	0,037989	0,328930				
0,466172	0,037111	0,075417	0,062159	0,264951	0,133790	0,244953	0,307353	0,041460	0,318555				
0,513393	0,031355	0,064219	0,060313	0,398151	0,064257	0,061392	0,277858	0,030078	0,470682				
0,362859	0,024546	0,063493	0,035395	0,198089	0,077215	0,092602	0,215699	0,021896	0,121024				
0,605769	0,038262	0,064867	0,059297	0,175880	0,078841	0,081289	0,226996	0,045060	0,386107				
0,446257	0,043419	0,074353	0,059613	0,189360	0,099800	0,156166	0,264743	0,040393	0,131156				
0,583883	0,564869	0,575012	0,059741	0,429403	0,631156	0,304855	0,296144	0,035769	0,494531				
0,531405	0,036120	0,066408	0,062735	0,146381	0,078805	0,079180	0,181863	0,043941	0,062960				
0,376125	0,032787	0,055556	0,054530	0,217047	0,059745	0,071363	0,123698	0,031183	0,301543				
0,395862	0,031315	0,054611	0,056126	0,129899	0,077032	0,111680	0,215718	0,028851	0,098763				
0,605721	0,022536	0,042379	0,038468	0,250636	0,044966	0,123680	0,208620	0,026223	0,462401				
0,410020	0,029432	0,063023	0,043340	0,189803	0,065965	0,167028	0,272787	0,028642	0,207242				
0,540594	0,033872	0,055963	0,058797	0,293745	0,265756	0,154265	0,371008	0,038546	0,284245				
0,434529	0,038167	0,080192	0,057773	0,206965	0,099604	0,199177	0,269527	0,035038	0,112128				
0,661145	0,033193	0,068642	0,055014	0,350003	0,065951	0,417025	0,396306	0,033538	0,446396				
0,443836	0,036944	0,069605	0,061698	0,193367	0,077804	0,112134	0,210988	0,039709	0,077725				
0,699426	0,055789	0,076543	0,055537	0,289417	0,072060	0,136733	0,246469	0,038268	0,210850				
0,432523	0,033780	0,063541	0,058141	0,175669	0,076720	0,143292	0,237561	0,037516	0,173380				
0,600105	0,449432	0,069253	0,071633	0,450778	0,480084	0,488971	0,437007	0,034890	0,434580				
0,355458	0,025200	0,047743	0,050249	0,171098	0,061046	0,056698	0,166645	0,024814	0,065800				
0,579885	0,031563	0,059913	0,056761	0,253660	0,059314	0,081211	0,201666	0,032191	0,252161				
0,457632	0,033019	0,068411	0,058250	0,208328	0,102753	0,200512	0,258876	0,032801	0,172294				
0,699081	0,031084	0,322513	0,050522	0,390247	0,072002	0,076800	0,331491	0,031230	0,549913				
0,555905	0,031429	0,073507	0,071634	0,156258	0,073733	0,173471	0,266718	0,035365	0,193051				

10.2 Aprovação do projeto pelo comitê de ética

Aprovação do projeto: “Análise do espectro molecular e clínico do câncer colorretal: da epidemiologia e qualidade de vida à genética e análises ômicas”.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO ESPECTRO MOLECULAR E CLÍNICO DO CÂNCER COLORRETAL: DA EPIDEMIOLOGIA E QUALIDADE DE VIDA À GENÉTICA E ANÁLISES ÔMICAS

Pesquisador: VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 52343821.2.0000.0004

Instituição Proponente: Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado Amazonas - FCECON

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.180.654

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto",

"Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1831358 de 14/12/2021) e dos demais arquivos anexados na PB.

Introdução: Com exceção das neoplasias de pele não melanoma, o Câncer Colorretal (CCR) é terceiro tumor mais incidente no mundo. Para cada ano do triênio 2020 – 2022, o Instituto Nacional do Câncer, estima 20.540 casos novos em homens e 20.470 em mulheres no Brasil. O aumento de casos se deve ao crescimento e envelhecimento da população, aos fatores de riscos relacionados, bem como, nos últimos anos, pela melhora de notificação do rastreamento de casos. A sobrevida dos pacientes está intimamente relacionada ao diagnóstico histopatológico da doença e o contexto socioeconômico que se insere. **Objetivo:** Descrever o perfil sociodemográfico, a microbiota tecidual e fecal, o perfil imuno-histoquímico relacionados a prognóstico, tratamento e a qualidade de vida de pacientes com Câncer Colorretal em unidade de referência em oncologia no Amazonas. **Métodos:** Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo com abordagem quantitativa, a ser realizado na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas. A amostragem será constituída de 150 dos pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de Câncer Colorretal atendidos no período de 2021/2 a 2025/1, identificados através da demanda espontânea do ambulatório da instituição. Serão utilizados como instrumento da

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

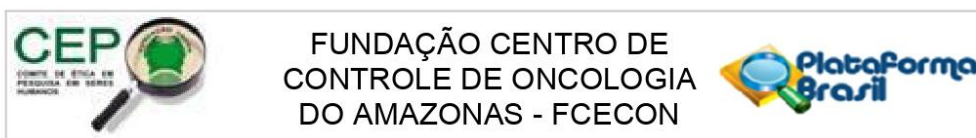
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 5.180.654

coleta de dados clínicos e biológicos um formulário de perguntas estruturadas e o questionário EORTC QLQ - C30+QLQ-CR29 (versão 3.0.) para a avaliação da qualidade de vida. Resultados esperados: Com os resultados do estudo, espera-se subsidiar informações para desenvolver estratégias, tanto no quesito prevenção, diagnóstico precoce e avaliação de qualidade de vida, bem como ampliar o entendimento da comunidade científica no que tange ao prognóstico da doença associado aos fatores que serão objeto desta pesquisa, dando luz a novos protocolos assistenciais de tratamento multimodal no câncer Colorretal.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

Caracterizar o perfil clínico, epidemiológico, imunológico, aspectos celulares e moleculares e microbiota, bem como, avaliar a qualidade de vida dos pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de câncer colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

Objetivos específicos:

- 1) Descrever os aspectos sociodemográficos e clínicos dos pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de câncer colorretal;
- 2) Avaliar a qualidade de vida dos pacientes com Câncer de Colorretal submetidos a tratamento na FCECON;
- 3) Investigar o perfil imunológico dos pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de câncer colorretal;
- 4) Realizar a caracterização genética de oncogenes e genes supressores relacionados ao Câncer Colorretal em amostra de tecido e biópsia líquida (ctDNA);
- 5) Descrever a prevalência de instabilidade de microssatélites em lesões colorretais;
- 6) Avaliar o envolvimento de micro-RNAs com câncer colorretal visando a formulação de novos protocolos de pesquisa com aplicabilidade para diagnóstico, melhor compreensão clínica e de respostas a tratamentos.
- 7) Descrever o perfil da microbiota intestinal de pacientes com câncer colorretal e associar a microbiota intestinal com a lateralidade do tumor relacionando ao prognóstico da doença.
- 8) Associar resposta ao tratamento (Follow up de 4 anos) com a qualidade de vida, o perfil imunológico, além da microbiota residente e transiente dos pacientes
- 9) Realizar o aconselhamento genético dos familiares de pacientes com Câncer de Colorretal com risco para Síndromes de Predisposição a Câncer Hereditário.

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

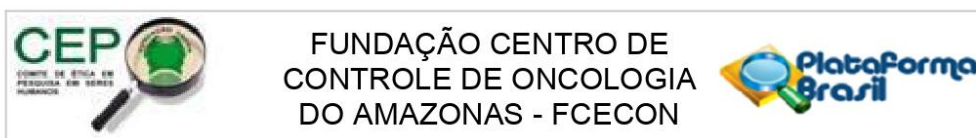
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 5.180.654

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos os pesquisadores dizem que como o projeto será incluso e adaptado na rotina, os pacientes que preencherem os critérios de inclusão, durante a consulta de rotina (antes do procedimento cirúrgico), serão abordados no serviço de cirurgia oncológica ou no serviço de endoscopia da FCECON. Os riscos estão relacionados à desconforto ou constrangimento ao responder a entrevista e o questionário, relacionado ao fato de poder lembrar-se de momentos tristes e difíceis da doença. Também pode haver o risco de vazamento de dados, portanto, para minimizar estes riscos a equipe será treinada com um curso de boas práticas em pesquisa clínica. É importante lembrar que a abordagem será feita por profissionais da área da saúde, os quais ao perceberem qualquer impacto psicológico gerado ao participante, o encaminharão ao setor de psicologia da unidade. Toda informação obtida no estudo será confidencial e os dados serão utilizados apenas pela equipe do estudo, que se comprometem em manter o sigilo dos dados obtidos. Aos familiares incluídos através do aconselhamento genético, os riscos estão relacionados a possíveis impactos na vida do familiar do paciente, caso confirme ser portador de alteração genética associada ao desenvolvimento do CCR. O conhecimento do risco genético pode impactar em níveis elevados de ansiedade de maneira que afete seu empenho nas atividades do dia a dia. Para minimizar estes riscos a equipe de pesquisa (grupo de genética - enfermeira, bióloga e médica oncogeneticista) conta com profissionais que irão acompanhar os testados positivos por no mínimo 4 anos.

Como benefícios, citam que a realização deste estudo deve possibilitar novas ferramentas para diagnóstico/prognóstico para o Câncer de Colorretal, permitindo o desenvolvimento de protocolos de ensaios de biologia molecular a serem implementados na rotina de atendimento aos pacientes. Além de proporcionar o conhecimento quanto as características moleculares de tumores de pacientes com CCR e investigando mutações genéticas e padrão metagenômico, considerados como patogênicos ou relacionadas à resistência ao tratamento. Conforme descrito anteriormente, a falta de estudos genéticos no CCR contribui para a falta de informação e aplicação de tratamentos mais pontuais, como atualmente descrito em diferentes ensaios clínicos visando a "Medicina de Precisão". Os dados a serem obtidos na FCECON somados aos que serão adquiridos nas outras regiões brasileiras, proporcionarão um conhecimento e um entendimento mais fidedigno sobre a prevalência de mutações genéticas ligadas ao CCR e seus tipos na população desse estudo, servindo como base para a construção de novas hipóteses e realização de pesquisas futuras.

Os benefícios gerados através do rastreamento genético ao familiar, possibilitam atenção quanto

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

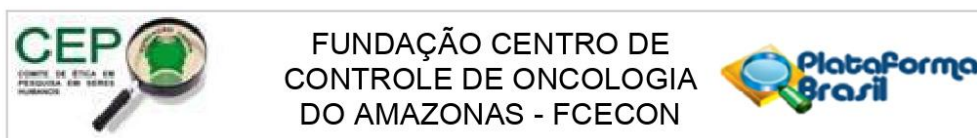
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 5.180.654

ao acompanhamento com oncologista ou especialista da área e realização de exames para diagnóstico precoce da doença conforme recomendações estabelecidas para casos de câncer hereditário, possibilitando a identificação de casos ainda não afetados pela doença e chances reais de sucesso ao tratamento.

Riscos e benefícios estão condizentes com a pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de extrema relevância que trará dados importantes para o estado do Amazonas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto - apresentado
2. Termo de anuência do pesquisador: apresentado
3. Termo de anuência institucional: apresentado
4. Anuências dos setores envolvidos: apresentados
5. Anuência da fonte patrocinadora: apresentada
6. TCLE: apresentado o do participante da pesquisa com câncer colorretal e do familiar
7. Termo do biorrepositorio: apresentado
8. Brochura do projeto: apresentado e necessita de adequação quanto ao objetivo específico.
9. Cronograma: apresentado
10. Orçamento: apresentado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto devera ser reapresentado com as devidas correções no prazo de 30 dias a partir da liberação do mesmo ao pesquisador.

Lembrando que existe o compromisso do pesquisador em divulgar os resultados da pesquisa (Res. CNS 5102016, Artigo 3o, Inciso IV).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1831358.pdf	14/12/2021 11:12:47		Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCCRcorrigir091221.docx	14/12/2021	VALQUIRIA DO	Aceito

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

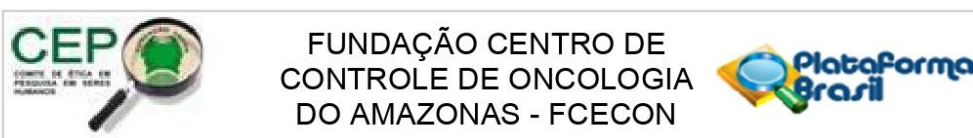
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 5.180.654

Brochura Pesquisa	ProjetoCCRcorrigir091221.docx	11:11:49	CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	cartaresposta131221.pdf	14/12/2021 11:11:11	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	cartaresposta251121.PDF	14/12/2021 11:10:47	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCCRcorrigir251121.docx	25/11/2021 13:30:35	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	carta_de_anuencia_servicos291021.PDF	29/10/2021 11:10:03	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	FAPEAM.pdf	29/10/2021 11:09:14	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_biorrepositorio291021.doc	29/10/2021 11:07:03	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_anuencia_pesquisadores291021.pdf	29/10/2021 11:06:25	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	Parecer_cientifico.pdf	29/10/2021 11:05:48	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	ProjetoCCRcorrigir271021.docx	29/10/2021 11:05:15	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCCR271021semmarcao.pdf	29/10/2021 11:03:18	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	CartadeAnuencialInstitucional291021.pdf	29/10/2021 11:02:51	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Cronograma	cronograma.doc	29/10/2021 10:59:29	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Orçamento	orcamento.doc	29/10/2021 10:59:09	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CCR_FAMILIAR291021.doc	29/10/2021 10:58:22	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

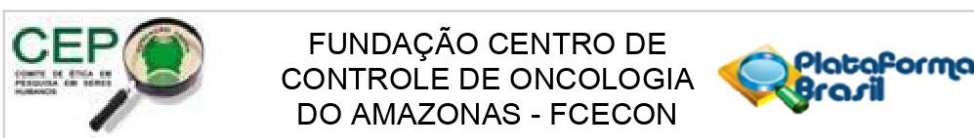
CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 5.180.654

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CCR291021.docx	29/10/2021 10:58:04	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_CCR.pdf	01/10/2021 15:33:32	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Outros	ficha_de_coleta_de_dados.pdf	30/09/2021 16:32:33	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.PDF	30/09/2021 16:31:08	VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 20 de Dezembro de 2021

Assinado por:
Lia Mizobe Ono
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N

CEP: 69.040-010

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-4774

E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br

10.3 Termo de Consentimento livre e esclarecido -TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

O (A) Sr (a) está sendo convidado a participar do projeto de **"ANÁLISE DO ESPECTRO MOLECULAR E CLÍNICO DO CÂNCER COLORRETAL: DA EPIDEMIOLOGIA E QUALIDADE DE VIDA À GENÉTICA E ANÁLISES ÔMICAS"**, a pesquisadora responsável é a Dra. Valquíria do Carmo A. Martins junto com o Dr. George Allan Villarouco da Silva e equipe. Os objetivos do estudo são: Conhecer como a doença apareceu e como o senhor (a) se sente nesse momento, iremos verificar como esta o seu intestino avaliando as suas fezes e o seu sangue. Outra coisa que também iremos observar é se a sua família tem o risco de ter a mesma doença que o senhor (a). P

O (A) Sr (a) está sendo convidado para participar desta pesquisa porque o senhor (a) foi diagnosticado com câncer colorretal e irá fazer tratamento aqui na Fcecon.

O (A) Sr (a). Tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento, sem penalização alguma para o tratamento que recebe nesta instituição. O seu tratamento não mudará mesmo que o senhor (a) não queira participar.

Caso o senhor (a) participe da pesquisa será necessário fazer uma entrevista com os pesquisadores falando sobre você e sobre como a doença começou se o senhor (a) tem casos na sua família. Além disso, você irá responder ao questionário (QLQ C30 e QLQ-C30 MOD CR29) que quer saber sobre a sua qualidade de vida geral. Os pesquisadores acessarão o seu prontuário para procurar informações escritas pelo seu médico sobre seu caso e para completar informações que não ficaram claras durante a entrevista.

A aplicação do questionário e a entrevista serão realizadas após sua consulta de rotina, no mesmo dia, no ambulatório de cirurgia oncológica da Fcecon. É possível que durante a entrevista o senhor sinta algum desconforto ou poderá ficar com vergonha de responder a entrevista e o questionário relacionado ao fato de poder lembrar-se de momentos tristes e difíceis da doença. É importante lembrar que as perguntas serão feitas por profissionais da

Rubricas _____ (Participante)

Página 1 de 4

_____ (Pesquisador)

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas – FCECON
Rua Francisco Orellana nº 215 – Planalto
Fone (92) 3655-4600 – Fax (92) 3655-4762
Manaus – Am CEP: 69040-010
www.fcecon.am.gov.br





área da saúde, se eles perceberem qualquer que o senhor (a) tenham ficado tristes ou deprimidos, os profissionais de saúde irão levar o senhor (a) para falar sobre isso com o psicólogo da unidade.

O senhor permite a equipe de pesquisadores registrem imagens através de fotografias das áreas doentes dentro do seu intestino durante o exame de colonoscopia, os pesquisadores se comprometem em preservar sua identidade e que ninguém vai usar suas fotos para outras finalidades.

Os materiais coletados do senhor serão utilizados exclusivamente para atender os objetivos da pesquisa. No caso de tratamento cirúrgico ou durante o exame de colonoscopia será coletada uma amostra da área doente, este material será coletado por profissionais da área da saúde mediante a necessidade do procedimento cirúrgico ou nova coleta para biópsia. Além disto, serão coletadas amostras de sangue total e fezes para avaliar como está a flora de bactérias no seu intestino e a sua imunidade. Durante a coleta de sangue, na rotina do laboratório da Fcecon, será separado um tubo com 5 ml de sangue total. Bem como, o senhor será orientado a coletar uma pequena amostra de fezes. As fezes deverão ser entregues para a equipe de pesquisa no laboratório de análises clínicas da FCECON no dia em que vier realizar seus exames pré-operatórios. Os resultados de todos os seus exames serão entregues ao senhor (a) e ao seu médico. A coleta de amostra e armazenamento seguem as exigências constantes no Anexo II da Norma Operacional 001/2013-CONEP/CNS em acordo com Resolução CNS 441/2011 e Portaria MS 2.201/11).

As amostras colhidas nesse trabalho serão armazenadas em Biorrepositório primeiramente, que é um tipo de depósito onde as amostras ficarão armazenadas no tempo de realização deste projeto de pesquisa, cuja guarda ficará com o pesquisador principal Dra. Valquíria Carmo dos Alves Martins e de responsabilidade institucional da FCECON, neste depósito permanecerá o tempo programado para realização do trabalho. Caso haja necessidade poderá ser prolongada mediante justificativa e aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa). Seu material biológico será armazenado sobre um sistema seguro de

Rubricas _____ (Participante)

Página 2 de 4

_____ (Pesquisador)

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas – FCECON
Rua Francisco Orellana nº 215 – Planalto
Fone (92) 3655-4600 – Fax (92) 3655-4762
Manaus – Am CEP: 69040-010
www.fcecon.am.gov.br





identificação, que garante o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos seus dados, para fornecimento de informações de seu interesse ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

Sua identidade pessoal e/ou profissional será excluída de todos e quaisquer produtos da pesquisa para fins de publicação científica. Caso a pesquisa lhe cause algum dano explicitado nos riscos ou ocorrido em razão de sua participação na pesquisa, seu direito de indenização será garantido de acordo com as legislações vigentes (item II.2.i, Res 466/2012/CNS e Constituição Federal Brasileira de 1988, artigo 5º, incisos V, X e XXVIII).

Com os resultados desta pesquisa, nós faremos a identificação de mudanças nas células do tumor e verificaremos como foi o resultado do tratamento utilizado no seu caso. Essas informações servirão para ajudar na escolha do tratamento de outros pacientes no futuro. Os benefícios da pesquisa podem não ser diretos ao senhor (a) mas poderá ajudar futuramente outros pacientes que irão se tratar na Fcecon.

Se achar necessário, o (a) Sr (a) dispõe de tempo para que possa refletir sobre sua participação, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida. (Res. 466/2012-CNS, IV.I.c)

O (A) S.r. (a). Pode entrar com contato com os pesquisadores responsáveis: Dra. Valquíria do Carmo A. Martins e Dr. George Allan Villarouco da Silva, (número disponível para contato: 981286213 e 98837-9411) e os colaboradores do projeto estarão disponíveis nesse número de telefone -36554774 ou no terceiro andar da Fundação Centro de Controle de oncologia – Fcecon, no Departamento de Ensino e pesquisa, para esclarecimento de qualquer dúvida que o senhor possa ter ou para dar qualquer informação que queira referente a sua participação no estudo, antes, durante ou depois do encerramento do projeto.

O (A) Sr (a). Também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (CEP/FCECON) e com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), quando pertinente. O CEP/FCECON está situado no 3º andar da Fundação Centro de Controle de

Rubricas _____ (Participante)

Página 3 de 4

_____ (Pesquisador)

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas – FCECON
Rua Francisco Orellana nº 215 – Planalto
Fone (92) 3655-4600 – Fax (92) 3655-4762
Manaus – Am CEP: 69040-010
www.fcecon.am.gov.br





Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) - Rua Francisco Orellana, 215, Planalto, CEP: 69040-01 - Manaus/AM, com horário de atendimento ao público em geral e aos pesquisadores às terças e quintas-feiras, das 08:00 às 12:00 horas; telefone: (92) 3655-4773 e e-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov. O CEP/FCECON é um colegiado multi e transdisciplinar, independente, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término pelo (a) Sr (a), ou por seu representante legal, e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou de riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Manaus, ____, _____, ____

Assinatura do participante da pesquisa

Nome e Assinatura do pesquisador responsável

Rubricas _____ (Participante)

Página 4 de 4

_____ (Pesquisador)



10.4 Formulário de coleta de dados

**FORMULÁRIO COLETA DE DADOS (1/2)****Paciente e Identificação no Projeto**

Identificação do projeto:

CÓDIGO DO PARTICIPANTE:

Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino

Data de nascimento:

Idade:

Dados sociodemográficos:Raça / Cor: ☐ Branca ☐ Parda ☐ Negra ☐ Amarela ☐ Indígena

Município de nascimento:

Estado:

Telefone:

Telefone acompanhante:

Dados comportamentais/epidemiológicos:

Peso atual

Altura

IMC

CMC

Prática de esporte: ☐ Sim ☐ NãoTabagismo? : ☐ Sim ☐ Não Consumo de álcool? : ☐ Sim ☐ NãoConsumo de comidas industrializadas: ☐ Sim ☐ NãoFrequência/Semana ☐ 1 a 7 ☐ não sabe ☐ + 7Come muita carne vermelha/processada (salsicha, calabresa, linguiça): ☐ Sim ☐ NãoFrequência/Semana ☐ 1 a 7 ☐ não sabe ☐ + 7Consumo de carne salgada: ☐ Sim ☐ NãoFrequência/Semana ☐ 1 a 7 ☐ não sabe ☐ + 7**Sintomatologia:**☐ Assintomático☐ Dor abdominal☐ Perda ponderal☐ Massa abdominal palpável☐ Náuseas e vômitos☐ Febre☐ Hemorragia intestinal☐ Anemia☐ Constipação☐ Alteração de hábito intestinal☐ Distensão abdominal☐ Astenia☐ Toque retal alterado☐ Fezes em fita☐ Outros



FORMULÁRIO COLETA DE DADOS (2/3)

Dados clínicos do Paciente

Data da coleta do material biológico: _____

Localização do tumor (CID): () CID-18 () CID-19 () CID-20

() Ceco	() Apêndice cecal	() Cólon ascendente
() Cólon transverso	() Cólon descendente	() Retossigmoide
() Reto		

Tipo de lesão ou tipo de doença:

() Polipose adenomatosa	() Adenocarcinoma
() Adenomatose familiar	() CCR hereditário sem polipose

Histologia do tumor primário:

() Bem diferenciado	() Moderadamente diferenciado
() Pouco diferenciado	() Indeterminado

Tipo histológico:

Adenocarcinoma / Carcinoma escamocelular / Diversos tumores / Carcinoma / Adenoc. Tubular Neoplasia maligna / Adenoc. mucinoso / Carcin. neuroendócrino
--

Estadiamento clínico: () I () II () III () IV

Metástase: () Sim () Não subcategoria

Tratamento: (Obs: informar a data de início do tratamento ao lado)

() Cirurgia	() Radioterapia	() Quimioterapia
() Neoadjuvante		

Recidiva: () Sim () Não

Histórico de doenças:

Infecções?

Crônicas?

Histórico de câncer?	() Sim	() Não
Na família?	() Sim	() Não

Qual? _____

