

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

JHONNATAN SILVA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES
IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL
TRATADOS EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Manaus – AM

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Jhonnatan Silva De Souza

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES
IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL
TRATADOS EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Valquíria Do Carmo Alves Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Luz Torres Silva

Manaus – AM

2025

Ficha Catalográfica

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

S729c Souza, Jhonnatan Silva de
 Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos
 solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade
 terciária na Amazônia brasileira / Jhonnatan Silva de Souza. - 2025.
 136 f. : il., color. ; 31 cm.

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

 1. Câncer colorretal. 2. Genômica. 3. Mediadores imunológicos. 4.
 Microbiota intestinal. 5. Inflamação. I. Martins, Valquíria do Carmo Alves.
 II. Silva, Kátia Luz Torres. III. Universidade Federal do Amazonas.
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. IV. Título

JHONNATAN SILVA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES
IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL
TRATADOS EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins (Presidente)
Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON

Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria (Membro Titular Interno)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie (Membro Suplente Interno)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Luciana Mara Fé Gonçalves (Membro Titular Externo)
Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas - Dra. Rosemary Costa Pinto - FVS-
RCP/AM

Profa. Dra. Laura Patrícia Viana Chaves (Membro Suplente Externo)
Universidade Estadual do Amazonas – UEA/ESA

Manaus, 29 de setembro de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico aos pacientes da Fundação CECON e à minha amada amiga e confidente, minha avó, Maria do Carmo da Silva. Mesmo muitas vezes agindo silenciosamente e intercedendo em meu favor, ela me educou com carinho e amor, ensinando-me a enfrentar os desafios da vida com leveza, coragem e perseverança. Sua sabedoria e dedicação foram faróis que iluminaram meu caminho e inspiraram cada passo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de amor, força, sabedoria e esperança, por me sustentar em cada passo desta jornada.

À minha família, por ser minha base inabalável, sempre presente com amor, acolhimento e apoio incondicional. Agradeço por acreditarem em mim mesmo nos momentos mais difíceis, quando até eu duvidava.

Em especial, à minha querida avó, **Maria do Carmo da Silva**, cuja presença tem sido um verdadeiro alicerce ao longo deste caminho. Mesmo sem compreender todos os aspectos do que eu fazia, esteve ao meu lado com amor genuíno, enxugando minhas lágrimas, celebrando minhas conquistas e orando incessantemente por mim. Sua fé e carinho foram essenciais para que eu não desistisse.

À minha querida avó, **Maria Auxiliadora Maia da Silva**, com sua maneira única de demonstrar amor, foi exemplo de força, coragem e determinação. Sempre valorizou a minha educação, me incentivou a sonhar alto e a acreditar no meu próprio caminho. Para mim, é fonte constante de inspiração.

Às minhas amadas amigas, **Ketleen Videu dos Santos e Mariana Pereira de Lima**, que sempre enxergaram em mim mais do que eu mesmo conseguia ver. Por estarem presentes em todos os momentos, oferecendo suporte, força, incentivo e, quando necessário, até as merecidas “puxadas de orelha”. Sou profundamente grato pelo amor, amizade, parceria e cuidado sincero com que me acolheram ao longo de toda essa caminhada.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins**, por sua orientação firme e generosa, pelos ensinamentos compartilhados com tanto zelo e pela confiança que sempre demonstrou em meu potencial. Sou especialmente grato pelas observações rigorosas e pelas correções necessárias, que hoje reconheço como gestos de profundo comprometimento com minha formação. Sua presença foi decisiva para meu amadurecimento acadêmico, profissional e pessoal.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Kátia Luz Torres Silva**, pelos valiosos ensinamentos compartilhados com imensurável elegância, delicadeza e carinho. Sua orientação sensível e constante incentivo foram fundamentais para que eu seguisse em frente e buscasse ser melhor a cada dia.

À minha grande amiga, minha dupla de caminhada e parceira de viagem, **Nayara Castro Sousa**, por estar sempre ao meu lado com dedicação, paciência e afeto. Agradeço pelos ensinamentos, pela ajuda constante, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos conselhos valiosos

e, sobretudo, pela linda amizade que construímos ao longo dessa jornada. Sou imensamente grato por acreditar em mim — e, mais ainda, por me fazer acreditar em mim mesmo.

Às minhas grandes amigas, **Nicolle Brandão, Delciany Mylla Parente, Geyse Silva e Wivian Silva** por sempre acreditarem no meu potencial e estarem ao meu lado quando mais precisei. Agradeço pelo apoio incondicional, pelas gargalhadas compartilhadas, pelos abraços apertados e por toda a leveza e afeto que tornaram essa jornada muito mais especial

Às minhas queridas colegas da Diretoria de Ensino e Pesquisa da FCECON — **Tatiana Pires, Sthéfanny Azevedo, Júlia Mônica Benevides, Cibele Menezes, Josiane Neves** — e ao meu aluno de iniciação científica, **Ronald Américo da Silva** — pela presença constante em minha trajetória e evolução acadêmica. Agradeço pelas trocas diárias, pelo companheirismo e, principalmente, pelas risadas que tornaram o caminho mais leve e cheio de boas memórias.

À equipe de funcionários do Setor de Endoscopia — **Thiago Paiva, Marcelo Tapajós, Ana Maria Bezerra, Deborah Prestes, Elymara da Silva, Thaynara Almeida, Karoliny Silva, Natasha Lima, Leina Tupinambá e Jaleel Benevides** — por estarem ao meu lado desde o início, oferecendo suporte nos recrutamentos de pacientes e nos procedimentos. Agradeço não apenas pela colaboração profissional, mas, sobretudo, pela amizade genuína que construímos ao longo dessa jornada, marcada pelo carinho, respeito e companheirismo.

À equipe de funcionários do Laboratório de Análises Clínicas — **Jacqueline Botelho, Jussara Praxedes, Saintclayton Soares, Eli Massao, Karina Ribeiro, Cristina Lopes, Georgiana Nascimento, Greicy Marques, Brena Lima, Lucilene Ferreira, Tassiana Davila e Jovanio Sarmento** — pela amizade sincera, pelos ensinamentos, incentivos e pelas alegrias compartilhadas. Guardarei com amor e gratidão em minha memória e no meu coração.

A todos os professores, colegas que tive o privilégio de conhecer ao longo da minha trajetória no mestrado, e aos dedicados funcionários do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Imunologia Básica e Aplicada, pela generosidade na partilha de conhecimentos, pelo apoio constante e pela amizade que tornou essa caminhada mais leve e enriquecedora.

À **Fundação Centro de Controle em Oncologia (FCECON)**, que se tornou minha segunda casa ao longo de sete anos, desde os primeiros passos na graduação até a concretização do mestrado. Em nome de sua Diretoria e de todos os colaboradores, expresso minha profunda gratidão pelo acolhimento, pelo incentivo constante e por me proporcionarem as condições necessárias para seguir e concluir mais essa etapa da minha jornada acadêmica e profissional.

Deixo minha profunda e enorme gratidão!!

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é a segunda neoplasia mais comum e resulta da transformação de células-tronco intestinais em malignas, influenciada por alterações genéticas, epigenéticas e fatores ambientais, como dieta e microbiota intestinal. Alterações na composição da microbiota, conhecidas como disbiose, estão associadas ao CCR e podem favorecer a inflamação crônica e progressão tumoral. **Objetivo:** Descrever o perfil da microbiota intestinal e dos mediadores imunológicos solúveis em pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na Amazônia brasileira. **Materiais e métodos:** Trata-se de um estudo observacional, descritivo e retrospectivo com abordagem quantitativa, realizado na Fundação CECOM com 60 pacientes com CCR, recrutados entre 2021 e 2025. Dados clínicos, sociodemográficos e hábitos de vida foram coletados por questionários, e amostras de sangue e fezes analisadas. Mediadores imunológicos (CXCL8, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10 e IL-2) foram quantificados por Cytometric Bead Array (CBA) e a microbiota intestinal caracterizada por sequenciamento de nova geração (NGS, Ion Torrent). **Resultados:** Foram incluídos 60 pacientes com amostras biológicas pareadas (sangue e fezes), dos quais a maior frequência dos participantes foi do sexo feminino (60%), com 86,7% acima dos 51 anos e a média de idade foi de 65 \pm anos. Entre os fatores de risco, 35% reportaram o tabagismo, 43,3% o etilismo e 50% consumiam alimentos industrializados regularmente. O histórico familiar de câncer foi relatado por 71,7%. A hipertensão estava presente em 23,3% e hipertensão junto com diabetes mellitus em 10%. As lesões predominavam no lado esquerdo (81,7%) e a maioria era câncer retal (C20 – 41,7%). A maioria dos pacientes estava nos estágios avançados da doença (Estágio III: 48,3%). O tratamento mais comum foi a combinação de cirurgia com quimioterapia e radioterapia (33,3%). Pacientes com CCRLD apresentaram aumento de CXCL8 ($p = 0,01$) e IL-6 ($p = 0,03$), enquanto IFN- γ e IL-2 foram reduzidos ($p = 0,009$; $0,007$) em comparação com aqueles com CCRLE. Para análise de estadiamento, observou-se aumento da CXCL8 ($p = 0,04$) para estágio III-IV. As assinaturas de mediadores imunológicos mostraram que os tumores de CCRLE tendem a ser mais inflamatório, enquanto os de CCRLD e em estágios avançados exibiram maior expressão de citocinas ligadas a progressão e imunossupressão. A diversidade microbiana foi em geral semelhante, com alguns indivíduos menos complexos, apresentando diferenças significativas pelos índices de *Shannon* ($p = 0,0043$) e *Simpson* ($p = 0,0035$). **Conclusão:** Pode-se inferir que variáveis clínicas e de estilo de vida influenciam o perfil dos pacientes, cuja microbiota apresentou diversidade homogênea, com predomínio de *Bacteroides* e presença de gêneros benéficos, mantendo função ecológica. Subgrupos com *Fusobacterium* indicam risco de disbiose e associação com CCR. Observou-se que as amostras apresentam diversidade homogênea, com alguns indivíduos menos complexos. O perfil de citocinas, associado à lateralidade e ao estágio tumoral, indica potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos. Tumores direitos apresentaram mais CXCL8 e IL-6, enquanto os esquerdos tiveram maior IFN- γ e IL-1 β .

Palavras-chaves: Câncer colorretal; Genômica; Mediadores imunológicos; Microbiota intestinal; Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the second most common malignancy and arises from the transformation of intestinal stem cells into malignant cells, influenced by genetic, epigenetic, and environmental factors, such as diet and gut microbiota. Alterations in microbiota composition, known as dysbiosis, have been associated with CRC and may promote chronic inflammation and tumor progression. **Objective:** To describe the intestinal microbiota profile and soluble immune mediators in patients with colorectal cancer treated at a tertiary care unit in the Brazilian Amazon. **Materials and Methods:** This was an observational, descriptive, and retrospective study with a quantitative approach, conducted at Fundação CECON with 60 patients with colorectal cancer recruited between 2023 and 2025. Clinical, sociodemographic, and lifestyle data were collected through questionnaires, and blood and fecal samples were analyzed. Immune mediators (CXCL8, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10, and IL-2) were quantified using Cytometric Bead Array (CBA), and the gut microbiota was characterized by next-generation sequencing (NGS, Ion Torrent). **Results:** Sixty patients with paired biological samples (blood and stool) were included, with the majority being female (60%), 86.7% over 51 years, and a mean age of $65 \pm$ years. Risk factors included smoking (35%), alcohol consumption (43.3%), and regular intake of processed foods (50%). A family history of cancer was reported in 71.7%. Hypertension was present in 23.3% and combined with diabetes mellitus in 10%. Lesions predominated on the left side (81.7%), mostly rectal cancer (C20 – 41.7%). Most patients were in advanced stages (Stage III: 48.3%). The most common treatment was surgery combined with chemotherapy and radiotherapy (33.3%). Patients with right-sided CRC (CRC-RS) showed increased CXCL8 ($p = 0.01$) and IL-6 ($p = 0.03$), while IFN- γ and IL-2 were reduced ($p = 0.009$; 0.007) compared to left-sided CRC (CRC-LS). Stage III-IV tumors also exhibited increased CXCL8 ($p = 0.04$). Immune mediator signatures indicated that CRC-LS tumors tend to be more inflammatory, whereas CRC-RS and advanced-stage tumors showed higher expression of cytokines related to tumor progression and immunosuppression. Microbial diversity was generally similar, with some individuals showing lower complexity, as indicated by Shannon ($p = 0.0043$) and Simpson ($p = 0.0035$) indices. **Conclusion:** Clinical and lifestyle variables appear to influence patient profiles. Microbiota diversity was generally homogeneous, dominated by Bacteroides and beneficial genera, maintaining ecological function. Subgroups with Fusobacterium suggest dysbiosis and CRC association. Cytokine profiles, linked to tumor laterality and stage, indicate potential biomarkers and therapeutic targets. Right-sided tumors had higher CXCL8 and IL-6, while left-sided tumors had higher IFN- γ and IL-1 β .

Keywords: Colorectal cancer; Genomics; Immune mediators; Gut microbiota; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2023 por sexo, não incluindo câncer de pele não melanoma	20
FIGURA 2	Funções da microbiota intestinal saudável.....	21
FIGURA 3	Barreira intestinal estável de um cólon saudável	23
FIGURA 4	Divisão anatômica do intestino grosso.....	24
FIGURA 5	Distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes na Região Norte do Brasil estimados para 2023 por sexo, não incluindo câncer de pele não melanoma	27
FIGURA 6	Representação da fisiopatologia da doença inflamatória intestinal	38
FIGURA 7	Mecanismos associados à microbiota na carcinogênese colorretal	39
FIGURA 8	Visão geral dos mecanismos patogênicos bacterianos na promoção do câncer colorretal	41
FIGURA 9	Regiões variáveis do RNA ribossomal 16S	45
FIGURA 10	Representação esquemática dos diversos métodos de sequenciamento de nova geração (NGS) utilizados para a avaliação da microbiota intestinal	46
FIGURA 11	Kit fornecido pela equipe de pesquisa para a coleta de amostras de fezes	52
FIGURA 12	Etapas para quantificação de citocinas por citometria de fluxo	52
FIGURA 13	Visão geral da análise BD® CBA.....	53
FIGURA 14	Fluxograma do esquema de processamento das amostras de fezes	54
FIGURA 15	Etapas para análise da microbiota intestinal para sequenciamento NGS..	56
FIGURA 16	Workflow do Ion AmpliSeq Microbiome Health Research Assay no Ion GeneStudio S5 System.....	57
FIGURA 17	Fluxograma da seleção de participantes.....	61
FIGURA 18	Diversidade alfa da microbiota bacteriana recuperada de amostras fecais de pacientes com CCR, atendidos na FCECON	69
FIGURA 19	Distribuição da abundância absoluta (log2) das OTUs identificadas nas amostras fecais de pacientes com CCR, atendidos na FCECON.....	71
FIGURA 20	Mapa de calor da abundância relativa de gêneros bacterianos identificados nas amostras fecais de pacientes com CCR, atendidos na FCECON	79
FIGURA 21	Perfil de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença	81

FIGURA 22	Assinaturas de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e o estadiamento da doença	84
FIGURA 23	Matrizes e redes integrativas de correlação de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença.....	88

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Sistema de Classificação TNM	28
QUADRO 2	Sistema de estadiamento	29
QUADRO 3	<i>Primers</i> sintetizados para o sequenciamento	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características sociodemográficas dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON	62
TABELA 2	Características dos fatores de risco dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON	64
TABELA 3	Características da classificação anatomopatológica, estadiamento e condutas terapêuticas dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON ...	67

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AHR	Aril-hidrocarboneto
AOM	Azoximetano
APC	Polipose adenomatosa Coli
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BAX	Proteína pró-apoptótica que acelera a morte celular apoptótica
BFET	Bacteroides fragilis enterotoxigênica
BFT	Toxina de Bacteroides fragilis
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CEP	Comitê de Ensino e Pesquisa
CCR	Câncer Colorretal
CCRLD	Câncer Colorretal de Lateralidade Direita
CCRLE	Câncer Colorretal de Lateralidade Esquerda
CCRm	Câncer colorretal metastático
CDs	Células dendríticas
CID	Classificação Internacional de Doenças
<i>cnf</i>	Gene do fator necrotizante citotóxico
DII	Doença inflamatória intestinal
dMMR	Deficiência dos Genes de Reparo de DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FadA	Fusobacterium adesina A
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
FHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
FOBT	Fecal Occult Blood Test
GalGalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GSK3β	Enzima Glicogénio Sintase Quinase-3 β
IFNγR	Receptor de interferon- γ
IgA	Imunoglobulina A
IgA-MAFF	Imunoglobulina A - Fator Funcional Associado ao Muco
IGF2	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-2
ILC	Célula linfóide inata
IL-1β	Interleucina 1 beta

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17p70	Interleucina 17p70
IL-18	Interleucina 18
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-33	Interleucina 33
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INF-γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico induzível
K-RAS	Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue
M	Presença de metástase em tecidos distantes
MAMP	Padrão molecular associado a micróbios
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MIN	Neoplasia intestinal múltipla
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade
miRNA	MicroRNA
MLH1	Gene Human Mut-L Homologue 1
MMR	Reparo de Incompatibilidade
MSCs	Células-tronco mesenquimais
MSH2	Gene Human Mut-L Homologue 2
MSH6	Gene Human Mut-L Homologue 6
MSI	Instabilidade de Microsatélites
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
N	Presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais
NGS	Next-Generation Sequencing
OTU	Unidades taxonômicas operacionais
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PD-L1	Ligante de morte programada 1
pks	Gene de colibactina
PMS2	PMS1 homolog 2
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SL	Síndrome de Lynch
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Tumor primário
TAMs	Macrófagos associados ao tumor

TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFBR2	Fator de crescimento transformador, receptor beta II
TIGIT	Imunoglobulina de células T e domínio ITIM
TLR	Receptor Toll-like
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
Th17	Linfócitos T helper 17
TLRs	Receptores Toll-Like
TNFRs	Receptores de Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNM	Sistema Internacional de classificação de tumores malignos
TP53	Gene supressor de tumor
Treg	Células T regulatórias
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer Colorretal – Aspectos Gerais	19
1.2 A microbiota intestinal saudável.....	20
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	24
2.1 Sítio do tumor primário e lateralidade	24
2.2 Epidemiologia do câncer colorretal.....	26
2.3 Estadiamento	28
2.4 Fatores de risco comumente associados ao câncer colorretal	30
2.5 Diagnóstico e tratamento do câncer colorretal.....	30
2.6 Carcinogênese do câncer colorretal.....	31
2.7 Mediadores imunológicos solúveis	33
2.7.1 O papel das citocinas inflamatórias no câncer colorretal	36
2.8 Microbiota intestinal e sua relação com o câncer colorretal	38
2.9 O sequenciamento da microbiota intestinal.....	43
2.10 Estratégias de sequenciamento	45
3 JUSTIFICATIVA.....	47
4 OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo Geral.....	48
4.2 Objetivos Específicos.....	48
5 METODOLOGIA	49
5.1 Tipo de estudo.....	49
5.2 Desenho do estudo, população do estudo e locais de execução	49
5.3 Amostragem	49
5.4 Critérios de elegibilidade.....	50
5.4.1 Critérios de inclusão.....	50

5.4.2 Critérios de exclusão	50
5.5 Métodos a serem aplicados e materiais a serem utilizados	50
5.5.1 Abordagem aos pacientes	50
5.5.2 Coleta e conservação de amostras biológicas.....	50
5.5.3 Caracterização dos mediadores imunológicos solúveis	52
5.5.4 Análise da microbiota intestinal	53
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
7 ASPÉCTOS ÉTICOS	60
8 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
8.1 Descrição sociodemográfica, clínica-epidemiológica dos participantes do estudo	61
8.2 Descrição da composição da microbiota intestinal de pacientes com câncer colorretal ...	68
8.2.2 Avaliação da diversidade alfa	68
8.2.3 Avaliação da abundância relativa.....	69
8.2.3.1 Firmicutes	72
8.2.3.2 <i>Bacteroidaceae</i>	74
8.2.3.3 <i>Enterobacteriaceae</i>	74
8.2.3.4 <i>Prevotellaceae</i>	75
8.2.4 Análise do mapeamento de assinaturas microbianas em câncer colorretal em pacientes atendidos na Fundação CECON	76
8.3 Descrição da avaliação dos mediadores imunológicos solúveis.....	80
8.3.1 Perfil geral de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença.....	80
8.3.2 Assinaturas de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e o estadiamento da doença	82
8.3.3 Matrizes e redes integrativas de correlação de mediadores imunológicos séricos em pacientes com CCR de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença.....	85
9 CONCLUSÕES	89

10 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	90
11 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91
12 ORÇAMENTO.....	92
13 FONTE DE FINANCIAMENTO	93
14 CRONOGRAMA.....	94
15 EQUIPE ENVOLVIDA	95
16 REFERÊNCIAS	96
17 APÊNDICES	113
17.1 APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	113
17.2 APÊNDICE II - Instrumento De Coleta De Dados	117
17.3 APÊNDICE III - Termo de Composição Biorrepositório.....	124
17.4 APÊNDICE IV – Protocolo de separação de plasma e buffycoat.....	126
17.5 APÊNDICE V – Protocolo de quantificação das citocinas por <i>Cytometric Bead Array – CBA</i>	127
17.6 APÊNDICE VI - Protocolo de extração do dna genômico da microbiota.....	131
17.7 APÊNDICE VII - Resultado do processamento das reads	133
18 ANEXOS.....	135
ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – FCECON)	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal – Aspectos Gerais

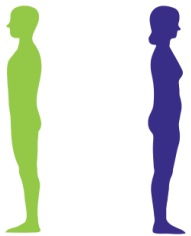
O Câncer Colorretal (CCR) é uma doença que tem origem em transformações das células-tronco intestinais, resultando na proliferação de células com comportamento mais agressivo e maligno (Zeki; Graham; Wright, 2011). A transição das células epiteliais normais para adenocarcinoma ocorre devido a alterações previsíveis, tanto genéticas quanto epigenéticas e histológicas (Kuipers et al., 2015). Em resumo, a seleção e expansão de células malignas são resultados de mutações genéticas em oncogenes e/ou genes supressores de tumor, os quais afetam a homeostase das células (Fearon; Vogelstein, 1990; Kuipers et al., 2015).

Predominantemente, esses tumores têm origem através de lesões pré-cancerosas conhecidas como pólipos, acometendo inicialmente o intestino grosso, denominado de cólon, a região terminal do intestino anterior ao ânus. Contendo como fatores de risco diversas causas (Sandler, 1996). O processo inicia-se com a formação de uma lesão pré-maligna, que podem ser os pólipos adenomatosos, hiperplásicos e/ou inflamatórios colorretais, crescendo ao longo da parede intestinal e potencialmente se espalhando, o que agrava a situação; 10% dos pólipos atingem 1cm de diâmetro, e cerca de um quarto destes se tornam cânceres. Estima-se que de 60 a 80% dos cânceres colorretais se desenvolvam a partir de um adenocarcinoma, que são tipos de pólipos que sofrem alterações. Os outros cânceres colorretais desenvolvem-se sem precedência de um tumor benigno detectável (Lafay; Ancellin, 2015).

De acordo com os dados da GLOBOCAN 2020, *Global Cancer Observatory*, CCR representa um relevante problema de saúde pública, correspondendo a aproximadamente 10% de todos os novos casos de câncer diagnosticados em 2020, apresentando um índice de mortalidade significativo de 9.4%. O CCR configura-se como o segundo câncer mais letal entre as neoplasias e o terceiro mais comumente diagnosticado no mundo, com cerca de 1,9 milhões de novos casos e quase 1 milhão de óbitos registrados no mesmo período (Sung et al., 2021). Nos Estados Unidos, de acordo com a *American Cancer Society*, estima-se aproximadamente 106.970 novos casos de câncer cólon e 46.050 novos casos de câncer retal para o ano de 2023. Dados indicam um aumento da incidência do CCR em indivíduos com idade inferior a 50 anos (American Cancer Society, 2023).

No Brasil, entre 2023 e 2025, estima-se 21.970 casos de CCR em homens e 23.660 em mulheres anualmente (**Figura 1**). Isso representa uma taxa de 20,78 casos por 100 mil homens e 21,41 por 100 mil mulheres. No Norte, a incidência é de 8,04 por 100 mil, sendo a terceira

mais alta. No Amazonas, em 2023, as taxas foram 8,30 para homens e 9,97 para mulheres, evidenciando o impacto significativo dessa doença no estado (INCA, 2022).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 1: Distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2023 por sexo, não incluindo câncer de pele não melanoma.

Fonte: (INCA, 2022)

1.2 A microbiota intestinal saudável

Foi constatado que uma ampla variedade de microrganismos, como bactérias, leveduras e vírus, habita diferentes locais do corpo humano, incluindo intestino, pele, pulmões e cavidade oral. A microbiota humana, frequentemente chamada de “órgão oculto”, contém mais de 150 vezes a quantidade de informações genéticas do que o genoma humano. Embora os termos “microbiota” e “microbioma” sejam usados como sinônimos, eles têm significados distintos (Hou et al., 2022). A microbiota intestinal é a mais estudada devido à sua maior diversidade e número de espécies em comparação com outras partes do corpo (Michaudel; Sokol, 2020; Quigley, 2013).

Microbiota refere-se ao conjunto complexo e diversificado de microrganismos vivos, incluindo bactérias, fungos e vírus, que habitam um ambiente específico, como a cavidade oral ou o trato intestinal. Esses microrganismos desempenham papéis cruciais na saúde e no equilíbrio do ecossistema do ambiente em que se encontram, influenciando processos fisiológicos e imunes. A composição e a função da microbiota podem variar amplamente entre diferentes locais do corpo e entre indivíduos (Hou et al., 2022).

O microbioma abrange todos os genomas dos microrganismos em um ambiente, incluindo comunidades microbianas, elementos estruturais, metabólitos e condições ambientais, sendo, portanto, mais amplo que a microbiota (Hou et al., 2022). Ele compõe nosso metagenoma, desempenhando papéis cruciais para a saúde, como auxiliar na metabolização de alimentos, na síntese de nutrientes e vitaminas (Pascale et al., 2018), além de influenciar a maturação do sistema nervoso (Fung; Olson; Hsiao, 2017) e do sistema imunológico (Palm; De Zoete; Flavell, 2015), e fornecer proteção contra patógenos (Abbas, 2012) (**Figura 2**).

Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na amazônia brasileira.

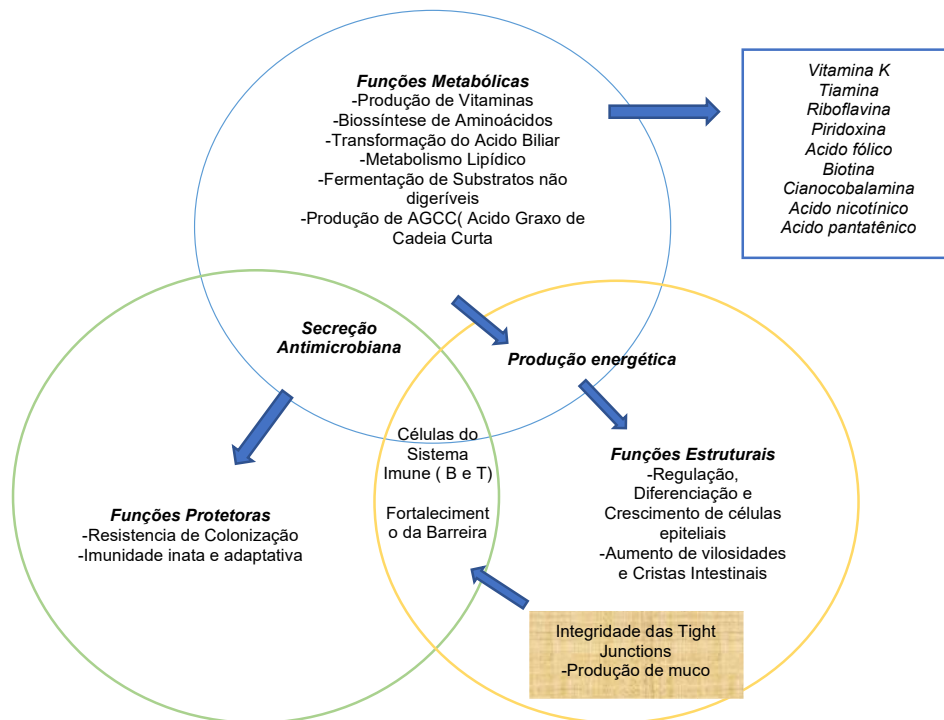


FIGURA 2: Funções da microbiota intestinal saudável.

Fonte: Adaptado de Pascale et al., 2018.

A barreira intestinal inclui aspectos mecânicos, químicos, imunológicos e microbianos. Urmi et al., mostraram que uma comunidade microbiana intestinal específica, associada à doença inflamatória intestinal (DII), pode causar danos à barreira intestinal por meio de células imunológicas (Urmi et al., 2017). Bactérias benéficas presente na microbiota intestinal podem desempenhar um papel imunossupressor, regulando as células imunológicas do hospedeiro (Allen-Vercoe; Coburn, 2020), enquanto bactérias nocivas podem induzir citocinas inflamatórias e promover danos intestinais através de interações com células imunológicas ou seus metabólitos (Stappenbeck; Virgin, 2016)

Foi estabelecido que a interação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro humano é essencial para manter a homeostase e a saúde humana (Dj; T, 2016). Portanto, não é surpreendente que a disbiose microbiana esteja associada a várias doenças metabólicas e inflamatórias, como colite ulcerativa, obesidade, diabetes mellitus e hipertensão (Lepage et al., 2011; Noce et al., 2019; Verdam et al., 2013). Além da composição taxonômica da microbiota intestinal, a diversidade intra e interindividual da comunidade microbiana é considerada de grande importância (Lepage et al., 2011; Montassier et al., 2014; Verdam et al., 2013).

Nos adultos, 90% das bactérias intestinais pertencem a 2 filos: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* completam os 10% restantes, juntamente com poucas espécies do domínio *Archaea* (Arumugam et al., 2011).

O componente viral é dominado por bacteriófagos. Sabe-se que desempenham um papel crucial

Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na Amazônia brasileira.

na formação do ecossistema, controlando a reprodução e a transferência horizontal de genes de espécies dominantes, mas a grande maioria das sequências virais partilham pouca ou nenhuma homologia com bases de dados de referência (Sutton; Hill, 2019). As leveduras formam uma comunidade pouco diversificada, menos de 20 espécies são identificadas no intestino saudável, a sua abundância relativa é 4-5 ordens de grandeza inferior à das bactérias, mas o seu tamanho celular e genoma são muito maiores, o que garante recursos funcionais integrados no ecossistema (Richard; Sokol, 2019).

No nível de cepa microbiana, cada indivíduo possui um padrão único de comunidades microbianas, com muitas cepas exclusivas que não são encontradas em outros. Variam entre diferentes partes do trato digestivo e entre o conteúdo fecal e a mucosa intestinal do mesmo indivíduo, embora as mesmas cepas geralmente sejam detectadas em proporções distintas. Estudos longitudinais mostram que fatores como a dieta, uso de medicamentos, viagens ou o tempo de trânsito colônico contribuem para a variabilidade na composição microbiana das amostras fecais do mesmo indivíduo. No entanto, as diferenças entre diferentes indivíduos são muito maiores do que as variações dentro de um mesmo indivíduo. A resiliência é uma característica crucial de um ecossistema microbiano intestinal saudável, caracterizada pela capacidade de retornar ao estado anterior à perturbação, por exemplo, após um episódio de diarreia ou tratamento com antibióticos (Fragiadakis et al., 2020).

Em um intestino saudável, a imunidade desempenha um papel importante na manutenção da homeostase. A proliferação e diferenciação das células T são inibidas, enquanto as células T regulatórias (Treg) permanecem ativas. A maioria das células do sistema imunológico, especialmente as células Treg, são capazes de produzir Interleucina 10 (IL-10) **(Figura 3)** (Chen et al., 2021).

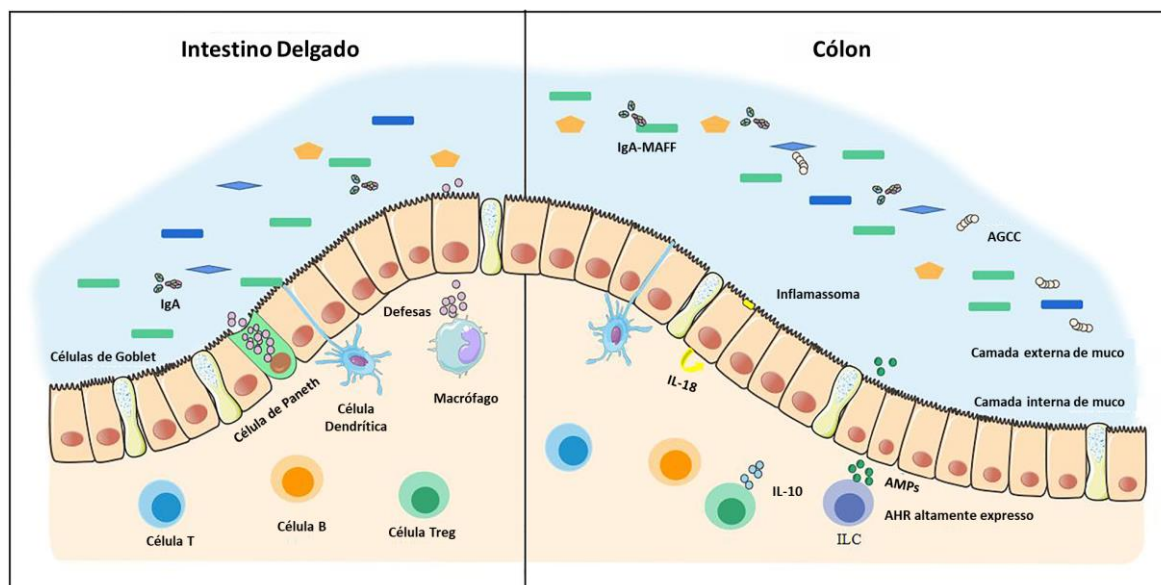


FIGURA 3: Barreira intestinal estável de um cólon saudável.

Nota: AGCC – ácidos graxos de cadeia curta; IgA – Imunoglobulina A; IgA-MAFF – IgA-Mucus-Associated Fractional Factor (Fator Funcional Associado ao Muco); ILC – Células linfoides inatas. IL-10 – Interleucina 10; IL-18 – Interleucina 18.

Fonte: Retirado de Yongyan et al., 2021.

A IL-10 inibe a produção de IL-12 e IL-23, limitando a diferenciação de células Th1 e a resposta de células Th17. A deficiência de IL-10 favorece a indução de Th17, podendo promover colite. Outro mecanismo crucial para a manutenção da homeostase intestinal é a ativação do receptor de aril hidrocarboneto (AHR). Quando ativado, o AHR estimula a liberação de IL-22, promove a expressão de IL-10R e fortalece as junções estreitas do epitélio intestinal, ajudando a preservar sua integridade. O AHR é amplamente expresso em células ILC2, também pode inibir a expressão do receptor ST2 para IL-33, que está frequentemente elevado em doenças inflamatórias intestinais (DII), e reduzir a produção de fatores pró-inflamatórios como IL-13. Em síntese, a homeostase intestinal depende da regulação de mediadores inflamatórios, e alterações na microbiota podem romper esse equilíbrio, resultando em inflamação exacerbada (Chen et al., 2021).

Portanto, compreender a interação entre o sistema imunológico, os mediadores inflamatórios e a microbiota intestinal são essenciais para elucidar os mecanismos da resposta imune no câncer e na manutenção da homeostase intestinal. Considerando a escassez de estudos que abordem a relação entre microbiota intestinal e câncer colorretal, sobretudo na região Amazônica do Brasil, esse conhecimento torna-se crucial para o aprimoramento de estratégias terapêuticas e para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no manejo da doença. A investigação sobre como a microbiota modula a inflamação e a resposta imune pode abrir novas perspectivas para intervenções direcionadas e contribuir para a melhoria dos desfechos clínicos.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Sítio do tumor primário e lateralidade

O CCR engloba tumores malignos localizados no cólon, na junção retossigmoide e no reto (**Figura 4**). Este tipo de câncer é classificado de acordo com diversos critérios, incluindo os subtipos histológicos, a localização do tumor e as características moleculares específicas. Entre os subtipos histológicos, o adenocarcinoma é o mais comum, representando cerca de 85% dos casos globalmente. Esse subtipo é predominante devido à sua alta prevalência e impacto clínico significativo. O adenocarcinoma se origina nas células glandulares que revestem o intestino e é frequentemente associado a fatores de risco bem documentados, como dieta, histórico familiar e condições genéticas. Além do adenocarcinoma, o carcinoma mucinoso é outro subtipo importante, encontrado em 5-20% dos casos (Hugen et al., 2014).

No que diz respeito à patologia clínica, o adenocarcinoma colorretal mucinoso é encontrado com maior frequência no cólon proximal do que no cólon retal ou distal (Hugen et al., 2013; Lupinacci et al., 2014). As proporções de pacientes do sexo feminino e mais jovens com adenocarcinoma colorretal mucinoso são maiores em comparação com o adenocarcinoma colorretal não mucinoso. Além disso, os adenocarcinomas colorretais mucinosos são diagnosticados com mais frequência em estágios avançados e tendem a apresentar uma resposta mais fraca à quimioterapia em comparação com os adenocarcinomas não mucinosos (Luo et al., 2019).

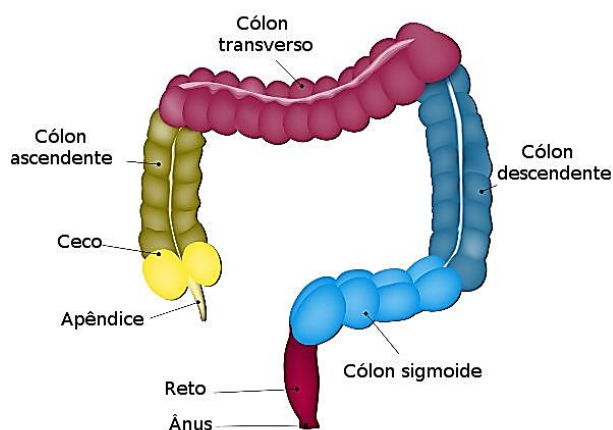


FIGURA 4: Divisão anatômica do intestino grosso.
Fonte: (Santos, 2023)

O CCR foi dividido também de acordo com a sua localização anatômica do tumor em três segmentos: cólon direito (ceco, cólon ascendente, flexura hepática e cólon transverso), cólon esquerdo (flexura esplênica, cólon descendente e cólon sigmoide) e reto (Keum; Giovannucci, 2019; Liang et al., 2024; Szostek et al., 2025).

O Câncer Colorretal de Lateralidade Esquerdo (CCRLE) tende a apresentar prognóstico mais favorável em comparação ao Câncer Colorretal de Lateralidade Direita (CCRLD), devido a características biológicas e moleculares distintas. Essas diferenças podem influenciar a eficácia dos tratamentos, com cânceres no cólon esquerdo mostrando uma resposta mais favorável a certos regimes de quimioterapia e terapias alvo (Petrelli et al., 2017). Estudos recentes ressaltam que o câncer colorretal é uma doença heterogênea, com variações clínicas, moleculares e embriológicas significativas entre tumores originados em diferentes regiões do cólon (Temraz et al., 2021). Clinicamente, há diferenças nos padrões de disseminação entre os lados direito e esquerdo do cólon. Tumores no cólon esquerdo estão mais associados ao risco de metástase hepática, enquanto tumores no cólon direito têm maior propensão para recorrência local e metástase pulmonar (Arnold et al., 2017).

Estudos demonstraram que a lateralidade do tumor não é apenas um indicador de diferenças nas características clínicas e moleculares, mas também possui valor prognóstico e preditivo no câncer colorretal metastático (CCRM) (Brulé et al., 2015; Missiaglia et al., 2014). Foi demonstrado que tumores do lado direito estão associados a um pior prognóstico em comparação com os tumores do cólon do lado esquerdo, devido ao fato de apresentarem sintomas tardios e serem diagnosticados em estágios avançados. Além do valor prognóstico, a localização do tumor primário tem consistentemente correlação com a resposta ao tratamento anti-EGFR em diversos estudos, independentemente do estágio no diagnóstico (Temraz et al., 2021).

Em relação à classificação molecular, a instabilidade microssatélite é considerada a segunda via molecular mais comum para o desenvolvimento de CCR, sendo a primeira via o adenoma-carcinoma que envolve mutações no gene supressor tumoral adenomatous polyposis coli (APC). Além de resultar de mutações germinativas na síndrome de Lynch e da polipose adenomatosa familiar (PAF), a instabilidade de microssatélites também está presente em até 20% dos CCR esporádicos (Geneve et al., 2019; Li et al., 2013).

O sistema de estadiamento TNM é uma classificação anatômica utilizada globalmente para diversos tipos de tumores, incluindo o câncer colorretal (Nagtegaal et al., 2017). O “T” refere-se à profundidade de invasão do tumor nas camadas da parede intestinal (T1, submucosa; T2, muscular própria; T3, gordura mesocólica ou mesorretal; T4, perfuração da serosa ou crescimento em órgãos adjacentes). O “N” indica o número de linfonodos envolvidos (N0, nenhum linfonodo; N1, 1-3 linfonodos; N2, 4 ou mais linfonodos) e o “M” indica a presença de metástase à distância (M0, sem metástase; M1, com metástase) (Nagtegaal et al., 2020).

Recentemente, a lateralidade do cólon tem sido considerada um fator prognóstico, embora o assunto seja controverso na literatura. Uma metanálise com 66 estudos por Petrelli et al. (2017), revelou uma redução no risco de óbito em 5 anos para tumores localizados no cólon esquerdo em comparação aos do cólon direito (HR 0,82; IC 95% 0,79-0,84). No entanto, em uma coorte de tumores colorretais esporádicos estádios I a III, Klose et al. (2021) não encontraram diferença entre os lados após pareamento por escore de propensão. A análise dos estádios separadamente mostrou que pacientes estágio II com tumores do lado direito tiveram melhor sobrevida do que aqueles com tumores do lado esquerdo (Klose et al., 2021).

No Brasil, os estudos que investigam a localização do tumor primário no câncer colorretal como fator prognóstico ainda são escassos e, em sua maioria, baseados em amostras reduzidas. Em uma coorte de pacientes submetidos à ressecção curativa de tumores de cólon, Lopez et al. (2019) não identificaram diferença estatisticamente significativa na sobrevida em cinco anos após ajuste pelo estadiamento (Bustamante-Lopez et al., 2019). De forma semelhante, Araujo et al. (2021), ao analisarem uma coorte hospitalar de pacientes com tumores colorretais estágio II e critérios de alto risco para recorrência, também não observaram diferença na sobrevida em cinco anos de acordo com a lateralidade do tumor (Araujo et al., 2021).

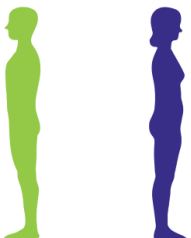
2.2 Epidemiologia do câncer colorretal

O CCR é o terceiro mais incidente (6,1%) e o segundo em termos de mortalidade (9,2%). Projeções indicam que, até 2035, o número óbitos por câncer de cólon no reto aumentará 71,5% e 60%, respectivamente (Douaiher et al., 2017). Essas taxas variam entre países, refletindo o nível de desenvolvimento econômico. Portanto, a doença é amplamente reconhecida como um indicador do desenvolvimento socioeconômico do país (Bray et al., 2018). O risco de sua ocorrência é associado, entre outros fatores, ao consumo frequente de carne vermelha, produtos processados e bebidas alcoólicas (Bray et al., 2018; Clinton; Giovannucci; Hursting, 2020).

O sobrepeso e a obesidade, frequentemente resultantes de estilos de vida pouco saudáveis, estão associados a um risco elevado de diversas doenças crônicas (Murphy et al., 2019). No contexto do CCR, a obesidade visceral tem sido relacionada a pior prognóstico em homens (Silva et al., 2020). Estima-se que cerca de 25% dos casos possuam predisposição genética. O desenvolvimento do CCR ocorre de forma lenta e progressiva ao longo de vários anos, o que torna essencial o diagnóstico precoce. Estratégias de rastreamento e intervenções nutricionais baseadas em dietas equilibradas configuram medidas relevantes de prevenção secundária (Zaytseva, 2021). Em nível global, o CCR apresenta crescimento na incidência, representando aproximadamente 11% de todos os diagnósticos de câncer (Wong et al., 2021).

Em 2020, foram estimados globalmente mais de 1,9 milhão de novos casos de CCR, representando 10% dos casos de câncer e tornando-o o terceiro mais comum. Entre os homens, foram registrados cerca de 1,1 milhão de casos, com uma taxa de 23,40 por 100 mil. Entre as mulheres, foram diagnosticados 865 mil casos, com uma taxa de 16,20 por 100 mil, tornando-o o segundo câncer mais comum. As maiores taxas de incidência em homens foram na Europa Central, Norte e Sul, e em mulheres, na Oceania e Norte da Europa (Ferlay et al., 2021).

Excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais frequentes no Brasil. As maiores taxas de incidência são observadas na Região Sudeste, tanto para homens (28,62 casos por 100 mil) quanto para mulheres (28,88 por 100 mil). No Centro-oeste, é o segundo mais incidente entre os homens (17,25 por 100 mil) e o terceiro mais incidente entre mulheres (16,92 por 100 mil). Na Região Sul, é o terceiro tumor mais frequente tanto para homens (26,89 por 100 mil) quanto para mulheres (26,04 por 100 mil). Nas Regiões Nordeste e Norte, ocupa a quarta posição para entre os homens, (com taxas de incidência de 10,99 por 100 mil habitantes no Nordeste e 7,05 por 100 mil habitantes no Norte), e entre as mulheres, é o terceiro mais frequente entre as mulheres na Região Norte (7,78 por 100 mil) e o quarto mais frequente na Região Nordeste (13,08 por 100 mil) (**Figura 5**) (INCA, 2022).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.760	26,5%			Mama feminina	2.410	22,4%
Estômago	1.200	11,5%			Colo do útero	1.980	18,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	880	8,5%			Cólon e reto	740	6,9%
Cólon e reto	690	6,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	650	6,0%
Cavidade oral	440	4,2%			Estômago	630	5,9%
Leucemias	440	4,2%			Leucemias	350	3,3%
Fígado	430	4,1%			Ovário	340	3,2%
Sistema nervoso central	320	3,1%			Fígado	320	3,0%
Esôfago	270	2,6%			Glândula tireoide	320	3,0%
Laringe	260	2,5%			Sistema nervoso central	270	2,5%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 5: Distribuição dos dez principais tipos de câncer mais incidentes na Região Norte do Brasil estimados para 2023 por sexo, não incluindo câncer de pele não melanoma.

Fonte: (INCA, 2022)

Em 2020, o Brasil registrou 20.245 óbitos por CCR, resultando em uma taxa de mortalidade de 9,56 por 100 mil habitantes. Entre os homens, houve 9.889 mortes, com uma taxa de 9,55 por 100 mil homens, enquanto entre as mulheres foram contabilizados 10.356 óbitos, com uma taxa de 9,57 por 100 mil mulheres (Brasil, 2023; INCA, 2023).

2.3 Estadiamento

Atualmente, o estadiamento da doença no momento do diagnóstico é um processo que não só define a abordagem terapêutica mais adequada, mas também permite uma estimativa mais precisa do prognóstico e ajuda a determinar a necessidade de tratamentos adjuvantes. O estadiamento é realizado por meio de exames de imagem, como tomografia de tórax, abdome e pelve, além de ressonância magnética da pelve para tumores localizados no reto médio ou baixo. O sistema de classificação TNM (tumores, linfonodos, metástases) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) é amplamente utilizado na pesquisa quanto na prática clínica para orientar o tratamento e avaliar o estágio da doença.

O sistema TNM avalia o estágio do câncer com base em três critérios: a extensão do tumor primário (T), a presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais (N), e a presença de metástases em tecidos distantes (M). Cada critério é complementado por números que indicam a gravidade da doença (Amin et al., 2017; Cowling et al., 2020). Este sistema, essencial para tumores sólidos, é amplamente utilizado para definir o estágio da doença e orientar decisões de tratamento, conforme detalhado nos **Quadros 1 e 2**, que detalham as categorias T0 a T4, N0 a N3, e M0 e M1 (Amin et al., 2017). A taxa de sobrevida dos pacientes está diretamente relacionada ao estágio TNM (Holch et al., 2017).

QUADRO 1: Sistema de Classificação TNM

T - Tumor primário	
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria os tecidos pericólicos
T4	Tumor invade e/ou perfura o peritônio visceral ou órgãos/estruturas vizinhas
T4a	Tumor perfura peritônio visceral
T4b	Tumor invade diretamente órgãos/estruturas vizinhas
N – Gânglios linfáticos acometidos	
N0	Não há metástases linfonodais
N1	Acometimento de 1 a 3 gânglios linfáticos
N1a	Acometimento de 1 gânglio linfático

N1b	Acometimento de 2 ou 3 gânglios linfáticos
N1c	Linfonodos negativos, mas depósitos tumorais presentes na subserosa, mesentério ou tecido pericolico/perirretal/mesorretal não peritonealizados
N2	Acometimento de 4 ou mais gânglios
N2a	Acometimento de 4 a 6 gânglios
N2b	Acometimento de mais de 7 gânglios
M - Metástase à distância	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástases em órgãos distantes ou peritônio
M1a	Metástases em 1 órgão e sem metástases peritoneais
M1b	Metástases em 2 ou mais órgãos e sem metástases peritoneais
M1c	Metástase em peritônio, com ou sem outros órgãos acometidos

Fonte: Adaptado da União Internacional Contra o Câncer (UICC), 8ª ed., (O'Sullivan et al., 2017)

QUADRO 2: Sistema de estadiamento de acordo com a AJCC 8ª edição

Estágios	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1 - T2	N0	M0
II	T3-T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Qualquer T	N1-N2	M0
IIIA	T1 - T2	N1 – N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3 - T4a	N1 – N1c	M0
	T2 - T3	N2a	M0
	T1 - T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
	T4b	N1 - N2	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1c

Fonte: Adaptado da União Internacional Contra o Câncer (UICC), 8ª ed., (O'Sullivan et al., 2017)

2.4 Fatores de risco comumente associados ao câncer colorretal

Os principais fatores de risco para o câncer colorretal (CCR) podem ser classificados em não modificáveis e modificáveis. Entre os fatores não modificáveis, destacam-se a idade igual ou superior a 50 anos, o sexo masculino, predisposição genética e doenças subjacentes. Homens apresentam maior risco, possivelmente devido à maior exposição a fatores ambientais e à ausência do efeito protetor dos estrogênios. A presença de histórico familiar de CCR ou de síndromes hereditárias, como a polipose adenomatosa familiar (PAF) e o CCR hereditário não polipose (síndrome de Lynch), aumenta significativamente a probabilidade de desenvolvimento da doença, especialmente antes dos 75 anos. Variantes genéticas de baixa penetrância também contribuem para o risco, mas mutações em genes-chave como APC (PAF), genes de reparo de incompatibilidade (síndrome de Lynch) e STK11 (síndrome de Peutz-Jeghers) estão associadas a um risco ainda mais elevado. Além disso, pacientes com histórico de doença inflamatória intestinal, sobretudo colite ulcerativa, apresentam risco relativo (RR) de 2 a 2,5, possivelmente devido à estimulação contínua da proliferação epitelial em um ambiente inflamatório (Cascella et al., 2018; Nguyen et al., 2009; Rezende et al., 2018; Smith et al., 2019).

Os fatores modificáveis, principalmente relacionados ao estilo de vida e à nutrição, desempenham papel importante na carcinogênese colorretal. Entre eles, destacam-se a obesidade, especialmente a visceral, que promove a liberação de adipocinas pró-inflamatórias; o sedentarismo; e padrões alimentares ricos em carne vermelha e processada, alimentos ultraprocessados e pobres em fibras, frutas e vegetais, como observados na dieta ocidental. O consumo excessivo de álcool contribui por meio da ação pró-carcinogênica do acetaldeído, que causa danos ao DNA e interfere no metabolismo do folato intracelular. Já o tabagismo prolongado está associado a alterações epigenéticas, como padrões aberrantes de metilação do DNA, e a subtipos de CCR com mutações em BRAF ou alta instabilidade de microssatélites. Outros fatores ambientais, como exposição ocupacional à radiação ionizante, também podem incrementar o risco de desenvolvimento da doença (Fusco et al., 2024; McNabb et al., 2020; Vernia et al., 2021).

2.5 Diagnóstico e tratamento do câncer colorretal

O diagnóstico precoce é crucial para expandir as opções de tratamento, mas a detecção em estágios iniciais ainda é muito baixa, resultando frequentemente em diagnósticos mais avançados e tratamentos tardios. A prevenção e detecção precoce do câncer CCR dependem de medidas que promovem mudanças no estilo de vida e educação em saúde, incentivando hábitos

saudáveis. Os sinais e sintomas a serem observados incluem hematoquezia, alterações intestinais como diarreia e constipação, perda de peso e cólicas abdominais. Além da sintomatologia, o diagnóstico pode ser realizado por exames de triagem, como o teste de sangue oculto nas fezes e o toque retal. Métodos de rastreamento mais detalhados, como exames endoscópicos e biópsias, são utilizados para confirmação diagnóstica por meio de histopatologia e imunohistoquímica (Santa Helena et al., 2017; Santos Jr., 2007).

Os tratamentos são definidos com base na relação entre benefícios, riscos e efeitos colaterais, e variam conforme o tipo e estágio da doença. Eles se dividem em tratamentos localizados e sistêmicos. Os tratamentos localizados, como cirurgia, radioterapia, ablação e embolização, tem por alvo o tumor diretamente sem afetar outras partes do corpo. Já os tratamentos sistêmicos incluem quimioterapia, terapia-alvo (como por exemplo, inibidores Do VEGF, do EGFR ou inibidores de vias específicas associadas a mutações genéticas, como BRAF ou KRAS, dependendo do perfil molecular do tumor) e imunoterapia, administrados por via oral ou intravenosa, dependendo do tipo de CCR (Pellino et al., 2018). A quimioterapia e a radioterapia neoadjuvantes são usadas para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia, melhorando o controle local e reduzindo a recidiva. Em alguns casos, podem resultar em uma resposta efetiva antitumoral completa, com ausência de células cancerígenas no tecido removido (Santos Jr., 2007).

2.6 Carcinogênese do câncer colorretal

Nos últimos anos, a incidência geral de CCR, apresentou redução entre indivíduos acima de 50 anos, especialmente em tumores de cólon, reto e porção distal. Em contrapartida, observou-se aumento significativo entre aqueles com menos de 50 anos. Esse crescimento pode refletir maior triagem nessa faixa etária, mas também está associado a fatores como adoção de dietas ocidentalizadas, estresse crônico e uso disseminado de antibióticos, os quais alteram a microbiota intestinal (Hofseth et al., 2020; Siegel et al., 2017). Adicionalmente, de 10% a 20% dos pacientes apresentam histórico familiar positivo, e aproximadamente 5% dos casos estão relacionados à síndromes hereditárias identificáveis por testes de linhagem germinativa (Dekker et al., 2019).

Os aspectos genéticos envolvidos no desenvolvimento do CCR estão relacionados à falta de estabilidade genômica ou epigenômica, observada na maioria das lesões neoplásicas iniciais no cólon (Colussi et al., 2013; Grady; Carethers, 2008). Essa instabilidade promove o acúmulo de mutações e alterações epigenéticas em oncogenes e genes supressores, favorecendo a transformação maligna das células (Fearon; Vogelstein, 1990; Kuipers et al., 2015).

O CCR mais comum, esporádico, é determinado pela instabilidade cromossômica com alterações numéricas e/ou estruturais no número de cromossomos, resultando em alta frequência de alterações do número de cópias somáticas do DNA, uma marca registrada de muitos tumores que evoluem para adenoma-carcinoma (Poulogiannis et al., 2010). Diferentes estudos associam a instabilidade cromossômica às mutações que inativam o gene supressor *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), o qual ocorre como um evento precoce no desenvolvimento da neoplasia do CCR (Müller; Ibrahim; Arends, 2016).

Outra forma menos comum de CCR esporádico é marcado pela instabilidade de microssatélite (MSI) e o elevado número de mutações decorrente da deficiência no sistema de reparo de DNA (dMMR) (Ibrahim et al., 2011). A hipermetilação da região promotora resulta no silenciamento de genes envolvidos no sistema MMR. O CCR hereditário, embora menos comum, pode resultar de mutações germinativas. Existem dois tipos principais: SL (com mutações em genes como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *EPCAM*, relacionados ao reparo de DNA) e PAF (causado por mutações no gene *APC*, que regula a via *WNT*) (Whiffin et al., 2014).

Quanto à origem das lesões e ao perfil celular/molecular apresentado, o CCR localizado no cólon direito e esquerdo apresentam diferenças significativas em termos de alterações histológicas e genéticas (Dienstmann et al., 2017; Dos Santos et al., 2019; Müller; Ibrahim; Arends, 2016; Santos Jr., 2007). Tumores no cólon direito são caracterizados pela apresentação de MSI com mutações em genes sistema de reparo de DNA, além de mutações em *BRAF*, *TGFBR2*, *IGF2*, *BAX*. Por outro lado, lesões originadas no cólon esquerdo frequentemente exibem falta de estabilidade cromossômica, inativação do gene *APC* e mutações em genes *KRAS*, *SMAD*, *TP53* (De Palma et al., 2019; Dos Santos et al., 2019). Além das alterações genéticas como assinaturas moleculares, a instabilidade epigenômica em diferentes estágios do CCR e de vários outros tipos de câncer tem sido alvo de investigações para diagnóstico e prognóstico (Chen et al., 2019; Xu et al., 2014).

O prognóstico para pacientes com CCR pode ser desafiador, mas a detecção e o tratamento precoces oferecem uma estratégia promissora para reduzir a mortalidade. Embora a colonoscopia seja o método mais eficaz para a detecção precoce do CCR, seu caráter invasivo e elevado custo limitam sua aplicação generalizada. Métodos de triagem não invasivos, como o teste de sangue oculto nas fezes (FOBT), têm baixa sensibilidade, especialmente para lesões pré-neoplásicas. Recentemente, a desregulação de miRNAs tem sido associada a várias etapas da iniciação e progressão do câncer, tornando a avaliação dos níveis de expressão de miRNAs relacionados ao CCR uma promessa para diagnóstico e prognóstico (Chen et al., 2019; Xu et al., 2014).

2.7 Mediadores imunológicos solúveis

A progressão tumoral é um processo complexo que envolve interações entre células cancerígenas, a matriz extracelular e o sistema imunológico. Este sistema compreende tanto as células imunes inatas quanto adaptativas, além de uma cascata proteica que modula a resposta contra o câncer. Entre essas proteínas, destacam-se as citocinas, uma família de proteínas séricas responsáveis pela comunicação e ativação dos diferentes tipos de leucócitos. As citocinas podem suprimir o crescimento tumoral ao estimular a exteriorização de antígenos, moléculas de adesão e a formação de fatores imunossupressores, ou contribuir para o desenvolvimento tumoral por meio de ações pró-inflamatórias que promovem a angiogênese e o escape das células mutantes devido à deficiência na imunovigilância, favorecendo a metástase (Czajka-Francuz et al., 2021).

Dentre as citocinas atuantes, existe um grupo conhecido como interleucinas, peças-chave no desdobramento da atividade citotóxica de linfócitos T e B, natural killers, macrófagos e outros potenciais infiltrantes do microambiente tumoral. As interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 se destacam principalmente por suas funções determinantes e controversas no prognóstico e na terapêutica do câncer colorretal. Embora ainda estejam sendo estudadas, a literatura já evidencia seus papéis na mudança de perfil dos linfócitos T para Th1, Th2 e Th17, suas relações com o comportamento fenotípico pró-inflamatório ou pró-regulatório de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (CDs), bem como a sinalização do estresse celular epitelial no sítio tumoral, que antecipa as mutações genéticas inativantes de receptores estruturais e solúveis, facilitando a evasão imune (Briukhovetska et al., 2021; Kaler; Augenlicht; Klampfer, 2009; West et al., 2015).

A IL-1 β , citocina da família IL-1, é produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células-tronco mutantes, desempenhando papel central na indução de IL-17 no perfil Th17, em humanos e murinos (Dmitrieva-Posocco et al., 2019). Ela regula a proliferação, diferenciação e apoptose celular, além de aumentar a expressão de citocinas como TNF- α e IL-6, através das vias TNFRs e TLRs. Essas vias estimulam linfócitos TCD4⁺ a secretar TNF- α e mobilizar fagócitos mononucleares, promovendo a transcrição gênica e a produção de pró-IL-1 β , uma proteína inativa de 31 kDa (Borowczak et al., 2022; Jain et al., 2020). Estudos clínicos em modelos murinos demonstraram que a IL-1 β contribui para o elevado potencial infiltrativo de neutrófilos no microambiente tumoral, promovendo uma ação pró-tumorigênica que evolue de inflamação crônica intestinal, decorrente de danos à mucosa, até o carcinoma associado à colite (CAC), uma das formas mais agressivas do CCR (Wang et al., 2014).

Pawan Kaler e colaboradores demonstraram, *in vitro*, que células do cólon estimulam macrófagos a liberar IL-1 β , o que ativa a via *Wnt* e promove o crescimento tumoral por meio da inativação de GSK3 β (Kaler; Augenlicht; Klampfer, 2009). Apesar disso, o papel exato da IL-1 β na patogênese do câncer colorretal ainda não é totalmente esclarecido. Estudos indicam que a IL-1 β é superexpressa em tecidos lesados e em células em pré-metástase, e que sua interação com IL-6 e a secreção de PGE₂ por células-tronco mesenquimatosas (MSCs), contribui para a formação de um microambiente imunossupressor. Esse ambiente altera o fenótipo epitélio-mesenquimal, aumentando a capacidade migratória das células, um processo crucial para a metástase (Izumi et al., 2015; Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017).

Dois estudos destacaram a relação entre níveis de citocinas e o prognóstico clínico em pacientes com CCR. Milone et al. (2021) observaram que pacientes submetidos à colectomia laparoscópica direita apresenta melhora clínica associada à redução sérica de IL-1 β e IL-6, além de diminuição de cortisol e outros mediadores hormonais do estresse pós-cirúrgico (Milone et al., 2021). De forma semelhante, Fouad et al. (2021) relataram que a quimioterapia com Fluoropirimidina para adenocarcinoma de cólon ascendente e descendente esteve associada a baixos níveis de IL-1 β e a melhora clínica, levantando também questões sobre a influência da localização anatômica do tumor na resposta imune e no prognóstico (Fouad et al., 2021).

A IL-6 integra um grupo de citocinas específicas da interação direta com a subunidade comum do receptor IL-6 α (IL-6R α) e na glicoproteína 130 (gp130). É um importante marcador de inflamação e imunidade, produzida principalmente por macrófagos no CCR (Mangan et al., 2006). A inflamação crônica associada à sinalização sustentada de IL-6 pode promover a transformação de células normais em células pré-malignas ou malignas. Após a transformação das células, a IL-6 associada à inflamação pode apoiar a progressão para um tumor totalmente desenvolvido. A sinalização da IL-6 em células pré-malignas leva à hiperativação da sinalização JAK/STAT3, resultando na regulação positiva dos genes alvo que estimulam a sobrevivência celular. A ativação persistente de STAT3 por IL-6 em células T reguladoras de tumores ajuda o epitélio transformado a escapar da citotoxicidade das células T CD8 + (Orange et al., 2023).

A literatura mostra que células natural killer T (NKT) secretam IL-13, o que induz a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 e aumenta a produção de IL-6, associada aos macrófagos tumorais (TAMs) (Schiechl et al., 2011). Além disso, a produção de IL-6 por fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células-tronco mesenquimatosas expostas a estresse molecular contribui para efeitos pró-tumorigênicos, como a instabilidade de microssatélites, induzida por Notch 1 e expressão de CD44, que sinaliza adesão e migração celular (Nagasaki

et al., 2014). Esses mecanismos resultam em uma significativa redução da sobrevida e das chances de cura. As principais fontes de IL-6 no microambiente tumoral são células tumorais, células estromais e células imunes infiltrantes, incluindo fibroblastos, MDSCs, TAMs e células T CD4⁺ (Orange et al., 2023).

A IL-10 exerce uma influência complexa sobre o microambiente tumoral, caracterizando-se por sua atividade imunossupressora e anti-inflamatória. Ela inibe a produção de imunoglobulinas e citocinas pró-inflamatórias, além de suprimir a proliferação e a expressão de antígenos em células nucleadas, linfócitos B, TCD4⁺, TCD8⁺ e células apresentadoras de antígeno (APCs). Essa ação resulta na desregulação da produção de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, essenciais para a imunovigilância, levando a erros genômicos e sinais de estresse celular que podem antecipar mutações neoplásicas. Assim, os efeitos pró-tumorais da IL-10 são evidentes, pois ela atua diretamente sobre as células anormais ou inibe a resposta do sistema imune adquirido (Junior, 2009).

Entre as citocinas envolvidas no CCR, o IFN- γ , também conhecido como IFN tipo II, desempenha um papel crucial em ambas as fases da imunidade, particularmente contra infecções virais e bacterianas. Ele ativa macrófagos e induz a expressão de MHC II. Alterações nos níveis de IFN- γ estão ligadas a doenças autoimunes e auto-inflamatórias devido aos seus efeitos imunoestimulantes e moduladores (Schoenborn; Wilson, 2007). Produzido por células NK, NKT, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e ILCs, o IFN- γ regula a apoptose no microambiente tumoral ao aumentar a apresentação antigênica, a atividade lisossômica dos macrófagos, e a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), além de induzir a produção de IgG por plasmócitos (Kosmidis et al., 2018).

Libin Guo e colaboradores afirmam, após estudos *in vitro* de linhagens celulares do cólon e reto, que células apresentadoras de genes KRAS/TP53 do tipo selvagem podem responder melhor ao tratamento com INF- γ , sendo um bom preditor para o prognóstico (Guo et al., 2022). Por isso, a queda nos níveis desta citocina associa-se à evolução benigna para maligna, além da perda de função das variações genéticas em suas subunidades e de seu receptor (IFN γ R), acentuando o risco de malignidade pela progressão adenoma – adenocarcinoma (Wang et al., 2015), mediada pela colite (Jeyakumar et al., 2019).

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) desempenha um papel crucial na patogênese de doenças inflamatórias, estando associado a um prognóstico desfavorável, danos celulares progressivos, perda de função, diminuição da produção hormonal e desregulação da homeostase (Huang et al., 2019). Principalmente secretado por monócitos e macrófagos ativados, o TNF- α se liga aos receptores TNF-R1 (p55) e TNF-R2 (p75) na superfície celular. Seu efeito citotóxico

pode levar a necrose hemorrágica, comprometimento vascular e isquemia, além de alterar geneticamente as células epiteliais mutantes para torná-las mais resistentes à apoptose e facilitar a metástase. O TNF- α também aumenta a produção de quimiocinas por células malignas sensíveis a ele, ativando a via oncogênica dependente de NF κ B e promovendo a formação do microambiente tumoral através da atividade dos fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (Stanilov; Dobrev; Stanilova, 2012).

Entender como o sistema imunológico funciona no desenvolvimento e progressão do câncer é uma das questões mais intrigantes da imunologia. Pesquisas feitas nas últimas décadas contribuíram para esclarecer por que a resposta a essa dúvida se evadiu por tanto tempo. O sistema imunológico realiza um papel duplo de resposta: ele não apenas suprime o crescimento do tumor destruindo as células cancerígenas ou inibindo seu crescimento, mas também possibilita sua progressão selecionando células mutantes aptas a sobreviver em um hospedeiro imunocompetente e estabelecendo condições dentro do microambiente tumoral que contribuem para o seu crescimento. Esta é uma estrutura conceitual unificadora chamada "Imunoedição do Câncer", que integra as funções duplas de proteção do hospedeiro e promoção do tumor desempenhadas pelo sistema imunológico (Schreiber; Old; Smyth, 2011).

2.7.1 O papel das citocinas inflamatórias no câncer colorretal

Em pacientes com neoplasias, as citocinas apresentam um padrão funcional complexo, no qual a expressão de uma citocina pode ser induzida ou suprimida por outra (Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014), cujo efeito foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Nakazaki, 1992). Por exemplo, o estímulo com TNF- α aumenta a produção de IL-1, que por sua vez estimula a produção de IL-6, contribuindo extensivamente para a progressão da doença (Carter et al., 1990; Nakazaki, 1992; Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014).

As principais citocinas que influenciam a resposta de fase aguda no câncer são a IL-6, IL-1 β e o TNF- α (Gulen et al., 2012; O'Riordain et al., 1999). Em pacientes com neoplasias, as citocinas apresentam um padrão funcional complexo, onde a expressão de uma citocina pode ser induzida ou suprimida por outra (Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014), conforme demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Nakazaki, 1992). Por exemplo, o estímulo com TNF- α aumenta a produção de IL-1, que por sua vez, estimula a produção de IL-6, contribuindo significativamente para a progressão da doença (Carter et al., 1990; Nakazaki, 1992; Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014).

Classicamente, as citocinas pró-inflamatórias são produzidas por diversas células do organismo, especialmente pelos macrófagos e células envolvidas na resposta humoral,

frequentemente encontradas no intestino humano (Cavaillon, 1994). Essas células desempenham um papel crucial na imunocompetência devido ao seu elevado potencial secretório, liberando mais de cem substâncias, incluindo citocinas, óxido nítrico, ânion superóxido e macromoléculas, como proteoglicanos de algumas bactérias da microbiota intestinal (Nathan, 1987).

Os macrófagos, componentes do sistema fagocítico mononuclear, atuam como uma linha de defesa contra agentes estranhos. Originados de monócitos circulantes, eles se deslocam para diversos tecidos corporais, sendo particularmente abundantes nos tecidos conectivos, no trato gastrointestinal, pulmões, fígado (células de Kupffer), pele (células de Langerhans) e baço, onde removem células sanguíneas senescentes. Também são encontrados na cavidade peritoneal e são Macrófagos ativados exibem marcadores específicos na membrana, possuem mais mitocôndrias e lisossomos, e secretam maiores quantidades de enzimas lisossomais e fatores de crescimento (Argilés; Busquets; López-Soriano, 2003).

A fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais inclui uma redução nos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs), resultando em uma menor diversidade e mudanças no perfil metabólico da microbiota intestinal, além da diminuição da camada de muco no intestino (**Figura 6**). A diminuição do muco enfraquece a barreira, permitindo maior contato entre as bactérias e o epitélio intestinal. Essa condição é exacerbada pela disfunção das junções estreitas das células epiteliais, o que aumenta a permeabilidade (Porter; Kalla; Ho, 2020; Ungaro et al., 2017). Dessa forma, a invasão bacteriana ativa as células imunes inatas, como macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs), que, por sua vez, atraem neutrófilos por meio da liberação de quimiocinas (Kobayashi et al., 2020).

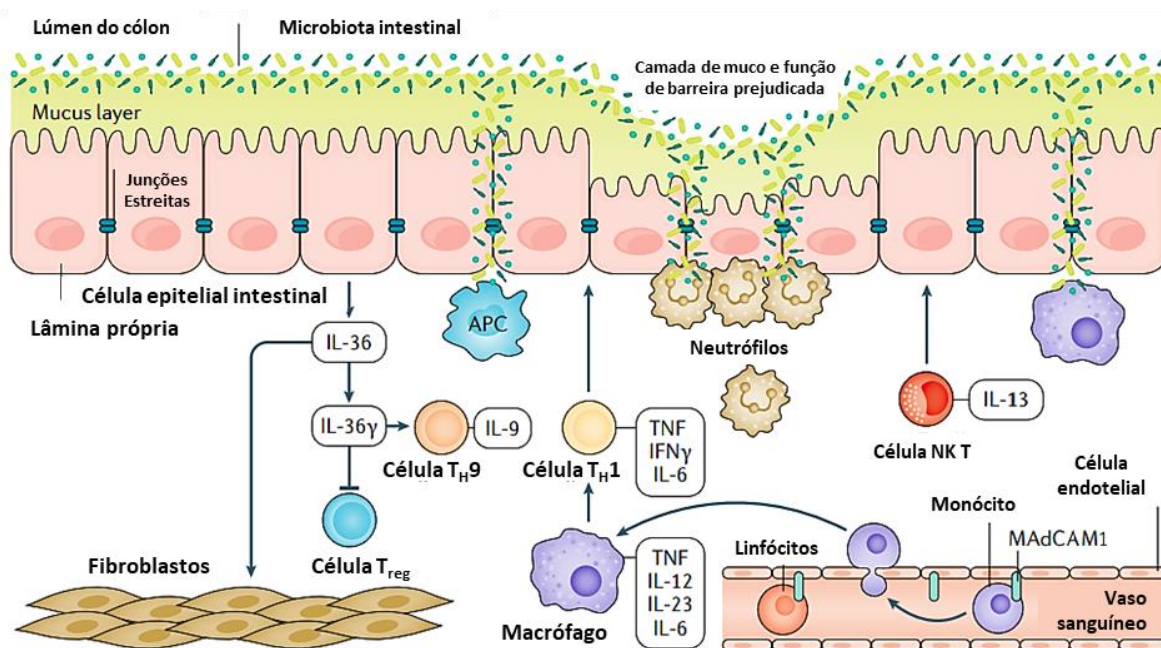


FIGURA 6: Representação da fisiopatologia da doença inflamatória intestinal.

Nota: APC– Célula apresentadora de antígeno; **MadCAM1**– Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1 / Molécula de adesão celular da mucosa vascular Addressin 1/ **IL-36** – Interleucina 36; **IL-36 γ** – Interleucina 36-gama; **IL-9** – Interleucina 9; **IL-6** – Interleucina 6; **IL-12** – Interleucina 12; **IL-23** – Interleucina 23; **IL-13** – Interleucina 13; **TNF** – Fator de Necrose Tumoral; **INF γ** – Interferon-gama; **Treg**– Célula T regulatória.

Fonte: Adaptado de Kobayashi et al. (Kobayashi et al., 2020).

2.8 Microbiota intestinal e sua relação com o câncer colorretal

O trato digestivo humano abriga mais de 10^{14} microrganismos, incluindo bactérias, eucariontes e vírus, que compõem a microbiota intestinal. Esta microbiota desempenha um papel crucial na digestão, metabolismo, homeostase epitelial e no desenvolvimento do tecido linfóide intestinal. Alterações na composição da microbiota, conhecidas como disbiose, podem levar a uma série de distúrbios, como doenças cardiometabólicas, inflamatórias, neuropsiquiátricas e vários tipos de câncer (Cuellar-Gómez et al., 2022).

Avanços nas tecnologias de sequenciamento metagenômico têm revelado que a disbiose é um fator de risco significativo para diversos distúrbios, incluindo alergias (Prince et al., 2015), obesidade, diabetes (Bouter et al., 2017), doença inflamatória do intestino (Halfvarson et al., 2017), síndrome do intestino irritável (Fourie et al., 2017) e especialmente câncer, com destaque para o CCR (Ferreira et al., 2014; Karlsson et al., 2013; Kennedy et al., 2014).

A carcinogênese colorretal resulta de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais, com estudos recentes destacando a relação entre inflamação, bactérias patogênicas, genotoxinas, estresse oxidativo, metabólitos e biofilmes na microbiota intestinal (Cheng; Ling; Li, 2020; Wong; Yu, 2023). Estudos recentes destacam a influência da microbiota intestinal na

carcinogênese colorretal por meio de vários mecanismos (Fusco et al., 2024; Grellier et al., 2024; Ionescu et al., 2025). Primeiramente, bactérias comensais podem ativar células mieloides associadas a tumores, promovendo inflamação que contribui para o câncer. Além disso, bactérias patogênicas podem aderir às células epiteliais intestinais, promovendo a tumorigênese. Genotoxinas bacterianas também causam danos ao DNA das células epiteliais, iniciando o CCR. A inflamação crônica resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que danificam o DNA. Metabólitos bacterianos, como ácidos biliares secundários, H₂S e compostos N-nitrosos (NOCs), também contribuem para a carcinogênese. Finalmente, biofilmes microbianos promovem a carcinogênese através da interleucina-6 (IL-6) e da ativação de STAT3 (**Figura 7**) (Cheng; Ling; Li, 2020).

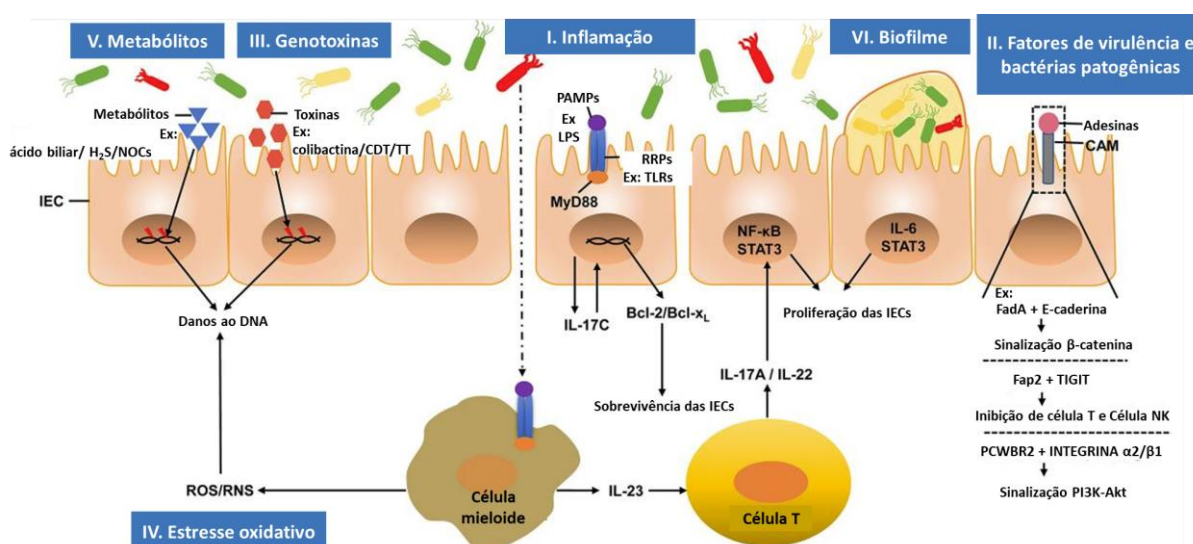


FIGURA 7: Mecanismos associados à microbiota na carcinogênese colorretal.

Nota: CEI, célula epitelial intestinal; H₂S, sulfureto de hidrogênio; NOCs, compostos N-nitrosos; CDT, toxina distensora citoletal; TT, toxina tifóide; MAMP, padrão molecular associado a micróbios; LPS, lipopolissacarídeo; PRR, receptor de reconhecimento de padrões; TLR, receptor Toll-like; MyD88, fator de diferenciação mieloide 88; NF-κB, fator nuclear-κB; STAT3, transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; CAM, molécula de adesina celular; FadA, *Fusobacterium* adesina A; TIGIT, imunoglobulina de células T e domínio ITIM; PCWBR2, suposta repetição de ligação à parede celular2; ROS, espécies reativas de oxigênio; RNS, espécies reativas de nitrogênio.

Fonte: Adaptado de Cheng et al. (Cheng; Ling; Li, 2020).

Evidências crescentes indicam que a disbiose local pode contribuir para o desenvolvimento do CCR, promovendo inflamação, proliferação celular e danos diretos ao DNA. Estudos destacam o papel de *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* e *Escherichia coli* produtora de colibactina na patogênese do CCR. Além disso, pacientes com CCR apresentam padrões distintos de colonização bacteriana nos tecidos tumorais em comparação com a mucosa não neoplásica e com indivíduos saudáveis (Da Costa et al., 2022; Fusco et al., 2024; Hou et al., 2022; Quaglio et al., 2022a). Em contraste, o papel das espécies

bacterianas esgotadas na tumorigênese intestinal é menos estudado devido à falta de técnicas apropriadas. No entanto, pode-se supor que a ausência de certas cepas bacterianas, como protetoras ou benéficas, pode ser tão relevante quanto o supercrescimento bacteriano associado ao tumor (Tilg et al., 2018).

A alta abundância das espécies *Bacteroides fragilis* e *Fusobacterium nucleatum* tem sido associada tanto à sobrevivência a curto prazo quanto à fase avançada do CCR. Em particular, em estágios avançados da doença (III/IV), observa-se um aumento significativo nos níveis de *B. fragilis* enterotoxigênico (BFET) e de *Fusobacterium spp.* quando comparados aos estágios iniciais (I/II). Além disso, a elevada quantidade de *Fusobacterium* está correlacionada com uma maior instabilidade de microssatélites (MSI), um marcador importante para a progressão da doença e resposta ao tratamento. Este padrão sugere que a presença desses microrganismos pode ter um impacto relevante na evolução do CCR e na resposta ao tratamento, destacando a importância de investigar a microbiota intestinal como um fator potencial na gestão e prognóstico da doença (Huo et al., 2022).

Espécies bacterianas como *F. nucleatum* e *B. fragilis* promovem o CCR através da secreção de fatores de virulência como FadA e BFT, que ativam as vias NF- κ B e β -catenina, gerando citocinas pró-inflamatórias. Esses fatores comprometem a E-caderina, facilitando a invasão bacteriana. Além disso, *E. coli* produtora de colibactina e ciclomodulina pode induzir apoptose e perturbar processos celulares normais. Biofilmes dessas bactérias criam um ambiente sinérgico que contribui para inflamação crônica, instabilidade genômica e proliferação celular epitelial, culminando no desenvolvimento do CCR (**Figura 8**) (Lawrence et al., 2020).

Em resumo, patógenos bacterianos contribuem para o CCR por meio da secreção de toxinas, ativação de vias inflamatórias e ruptura de barreiras protetoras, levando à inflamação crônica e instabilidade genômica (Lawrence et al., 2020). Após quimioterapia e radioterapia neoadjuvantes, a persistência de *F. nucleatum* está associada a altas taxas de recidiva em CCR avançado. Pacientes com níveis baixos de *F. nucleatum* têm sobrevida global e livre de doença significativamente mais longas em comparação com aqueles com níveis mais altos, especialmente em estágios avançados da doença (Huo et al., 2022).

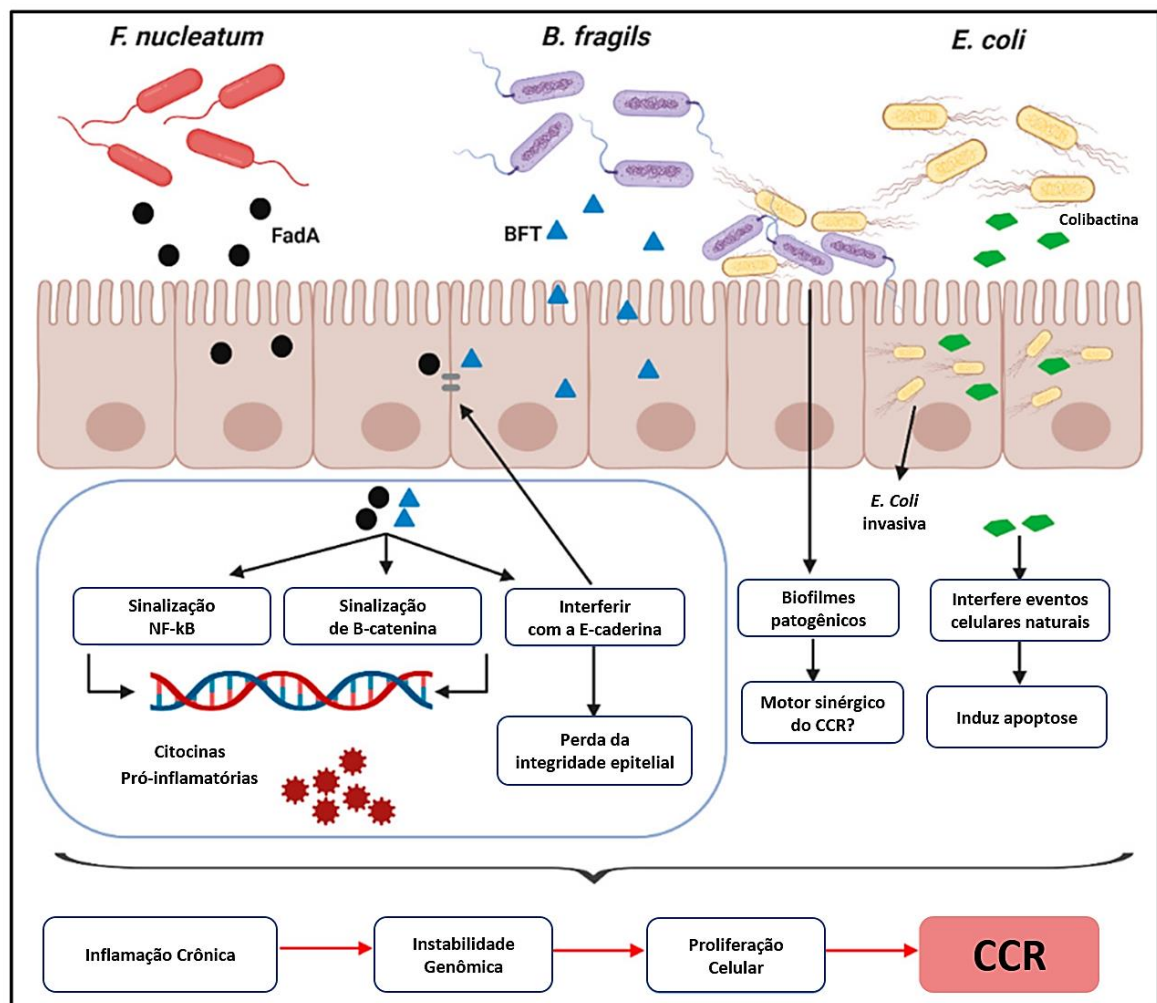


FIGURA 8: Visão geral dos mecanismos patogênicos bacterianos na promoção do câncer colorretal.

Nota: FadA= *Fusobacterium* adesina A; BFT= toxina de *B. fragilis*

Fonte: Adaptado de (Lawrence et al., 2020).

Fusobacterium nucleatum (Fn)

F. nucleatum é uma bactéria gram-negativa e um constituinte normal da cavidade oral humana. Como membro residente da microbiota oral, *F. nucleatum* tem sido estudada principalmente por seu papel na saúde periodontal e doença, devido às suas muitas adesinas que mediam a ligação a superfícies abióticas, células hospedeiras ou outros microrganismos (Signat et al., 2011). Essa espécie é reconhecida como um patógeno oportunista envolvido em processos inflamatórios, como periodontite, doença inflamatória intestinal, abscesso pancreático, parto prematuro e abscesso hepático, além de estar associada ao desenvolvimento e progressão de cânceres, incluindo CCR e câncer oral (Xu et al., 2020).

Enquanto *Fusobacterium spp.* raramente são detectados no intestino de indivíduos saudáveis, eles podem ser isolados de pacientes com doença inflamatória intestinal (Brennan; Garrett, 2019), o que reforça a ligação entre fusobactérias e um ambiente colônico inflamado. Estudos em amostras de CCR humano revelaram que *Fusobacterium spp.* frequentemente

concorre com outros anaeróbios gram-negativos, incluindo *Campylobacter ssp*, formando biofilme.

O papel de *F. nucleatum* na carcinogênese colônica tem sido implicado na progressão do carcinoma colorretal avançado. Estudos anteriores sugerem que essa espécie promove a carcinogênese do cólon através da inibição da proliferação e indução de apoptose em células T (Brennan; Garrett, 2019; Cuellar-Gómez et al., 2022, 2022; Kostic et al., 2013). Outros estudos revelaram que níveis elevados de *F. nucleatum* no tecido do cólon estão inversamente correlacionados com a densidade de Células T CD3+ e fortemente associados a instabilidade de microssatélites (MSI) e ao fenótipo metilador CpG (Dadgar-Zankbar et al., 2024; Ou et al., 2022).

Uma questão frequente é como *Fusobacterium*, uma bactéria oral, pode colonizar tecidos colorretais. Estudos sugerem que a proteína de adesão Fap2 de *F. nucleatum* se liga à D-galactose- β (1-3)-N-acetil-D-galactosamina (GalGalNAc), abundante em células de CCR (Kostic et al., 2013). Além disso, a *Fusobacterium* adesina A (FadA) pode facilitar a aderência de *F. nucleatum* à caderina E das células epiteliais intestinais (Rubinstein et al., 2013). *F. nucleatum* pode, assim, colonizar seletivamente os tecidos do CCR através de Fap2 e FadA e, quando em contato com células epiteliais intestinais, ativar a β -catenina, levando a crescimento celular descontrolado e aquisição de um fenótipo semelhante a células-tronco (Abed et al., 2016; Rubinstein et al., 2013; Xu et al., 2020).

Escherichia coli

A colonização da mucosa intestinal por *E. coli* produtora de colibactina é mais comum em pacientes com CCR em estágios avançados do que em estágios iniciais. Essas cepas aceleram o crescimento tumoral em modelos de neoplasia intestinal múltipla (MIN) (Bonnet et al., 2014). Diferente de outros estudos, o estudo de Shimpoh et al., mostrou que a prevalência de *pks* + *E. coli* em amostras de CCR foi menor do que no controle saudável. No entanto, é interessante notar que Shimpoh et al. usaram lavagem colônica em vez de amostras de biópsias (Shimpoh et al., 2017). É particularmente relevante mencionar que, em pacientes com CCR, a maioria das cepas de *E. coli* produtoras de ciclomodulina abrigam o agrupamento de genes *pks* ou a combinação de ilha *pks* com genes *cnf*. Esta ilha genômica pode desempenhar um papel crucial na distribuição de *E. coli* produtora de ciclomodulina. Além disso, foi sugerido que a presença da ilha genômica *pks* pode facilitar a colonização da *E. coli* no trato intestinal (Buc et al., 2013).

Pesquisas sobre a genotoxina bacteriana mostraram que, em camundongos Il10 -/- tratados com azoximetano (AOM), a presença de *E. coli* comensal induziu mais danos em comparação ao controle. A colibactina induz danos no DNA, levando a mutações e instabilidade cromossômica. Além deste efeito genotóxico, a *E. coli* produtora de colibactina pode induzir senescência celular associada à produção de fatores de crescimento, promovendo crescimento tumoral (Dougherty; Jobin, 2021; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020). Em geral, parece que a *E. coli* pode desempenhar um papel significativo na carcinogênese do CCR, mas são necessárias mais pesquisas para confirmar o potencial desta bactéria na promoção do CCR (Dougherty; Jobin, 2021; Nouri et al., 2022; Sadeghi; Mestivier; Sobhani, 2024).

Bacteroides fragilis

O gênero *Bacteroides*, principalmente *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), tem sido associado ao desenvolvimento do CCR. Assim como o *Fusobacterium*, alguns estudos encontraram que *Bacteroides* enriquecido em amostras de fezes de pacientes com CCR e em tecido tumoral em comparação com a mucosa normal (Feng et al., 2015; Marchesi et al., 2011; Nakatsu et al., 2015; Zeller et al., 2014). No entanto, outros estudos não encontraram diferença ou relataram uma diminuição relativa na abundância de *Bacteroides* no CCR (Bundgaard-Nielsen et al., 2019; Kostic et al., 2012; Zackular et al., 2014).

Sabe-se que *B. fragilis* enterotoxigênico (BFET), mas não *B. fragilis* não toxigênico, induz a formação de tumores no modelo de camundongo ApcMin / + (Geis et al., 2015; Housseau et al., 2016; Wu et al., 2009), indicando que qualquer associação entre esta espécie e o desenvolvimento de CCR pode estar especificamente relacionada à presença da toxina de *B. fragilis* (BFT). Consistente com isso, descobriu-se que o gene BFT é expresso em uma taxa mais alta em isolados de *B. fragilis* obtidos de amostras de mucosas e de fezes de pacientes com CCR em comparação com controles (Boleij et al., 2015; Toprak et al., 2006) e foi demonstrado que BFT ativa a β -catenina. sinalização em células CCR humanas (Wu et al., 2003).

2.9 O sequenciamento da microbiota intestinal

O conhecimento sobre microbiota intestinal, inicialmente proveniente de estudos de culturas de microrganismos, expandiu-se, permitindo o entendimento da organização microbiana e das interações entre várias espécies em comunidades complexas (Mackie; Sghir; Gaskins, 1999). Resultados de experimentos em animais e estudos celulares, fisiológicos e epidemiológicos têm demonstrado que essas comunidades podem desempenhar um papel importante sobre a saúde humana, no risco de doenças, e participam ativamente no desenvolvimento de resistência microbiana e na resposta a medicamentos (Burcelin et al.,

2013). O advento da biologia molecular reduziu as limitações encontradas no uso de métodos de cultivo, além de revelar novas perspectivas sobre a diversidade de microrganismos existentes na microbiota intestinal humana (Li et al., 2012).

Os estudos de microbiota têm sido impulsionados pelo desenvolvimento de técnicas para análise de metagenômica, na qual o conjunto dos genomas de uma comunidade microbiana é determinado. O sequenciamento de nova geração (NGS) permite determinar a diversidade microbiana por duas abordagens: sequenciamento de *amplicon* e *shotgun*. O primeiro consiste em amplificar alvos taxonomicamente informativos como o rRNA 16S de procariotos. O sequenciamento *shotgun* reconstrói grandes fragmentos ou até todo o genoma dos organismos, sendo mais oneroso (Escobar-Zepeda; Vera-Ponce de León; Sanchez-Flores, 2015). O sequenciamento de *amplicon* também é chamado de *metabarcoding*.

O processo de metagenômica por *shotgun* se diferencia do *metabarcoding* pelo método de construção de bibliotecas e pelo processo de montagem, que envolve genomas inteiros. A chamada de genes pode ser realizada através de *reads* individuais, sequências maiores de *reads* com sobreposição chamadas *contigs*, ou ambos (Kunin et al., 2008). Sequências repetidas, cobertura insuficiente, erros de sequenciamento e variação no conteúdo gênico a nível de cepas resultam em genomas fragmentados após a montagem, necessitando de mais uma etapa chamada *binning* para classificar os *contigs* em grupos a nível de espécie (Alneberg et al., 2014)

O principal alvo molecular para a análise das comunidades bacterianas é a subunidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA, que possui regiões altamente conservadas no domínio, intercaladas por regiões variáveis, as quais possibilitam estudos de caracterização filogenética de grupos e de espécies de bactérias. Essas regiões são denominadas de V1 a V9 (**Figura 9**) (Tannock, 2002). De maneira geral, a região V4 é a mais utilizada em estudos de microbioma, por representar fielmente o perfil taxonômico das comunidades microbianas, quando comparada à caracterização utilizando a sequência completa do gene 16S rRNA (Liang et al., 2019; Tannock, 2002). Na análise de *metabarcoding*, é realizado um PCR com *primers* específicos para a região V4 do gene 16S rRNA para amplificação em bactérias e arqueias. Aos produtos amplificados são adicionados um *barcodes* para identificação das amostras. Os produtos de PCR das amostras individuais podem então ser combinados para a reação de sequenciamento massivo paralelo (Kumar et al., 2014).

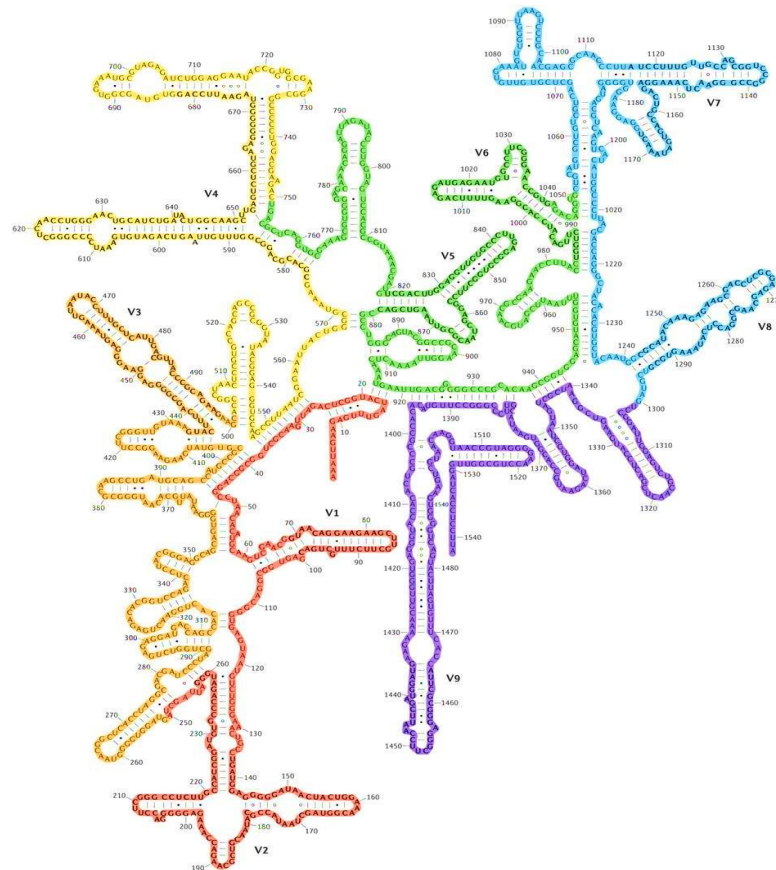


FIGURA 9: Regiões variáveis do RNA ribossomal 16S.

Nota: As regiões estão representadas por cores diferentes. **VERMELHO:** V1 e V2; **LARANJA:** V3; **AMARELO:** V4; **VERDE:** V5 e V6; **AZUL:** V7 e V8; **ROXO:** V9.

Fonte: Adaptado de Yarza et al., 2014.

As plataformas de NGS disponíveis são capazes de sequenciar simultaneamente milhões de moléculas de DNA com baixo custo, cada um com diferentes comprimentos de sequência e rendimentos. Exemplos dessas plataformas incluem *Roche 454*, *Illumina*, *Ion Torrent/S5* e *PacBio RSII*. A plataforma *Ion Torrent/S5* (*Thermo Fisher Scientific*) detecta a mudança no potencial de hidrogênio gerado após a adição de um nucleotídeo em cada um de seus micropoços. O rendimento máximo dessa plataforma é de aproximadamente 60 milhões de *reads* com a média do comprimento de até 400 pb (Escobar-Zepeda; Vera-Ponce de León; Sanchez-Flores, 2015).

2.10 Estratégias de sequenciamento

O sequenciamento metagenômico fornece uma análise aprofundada das capacidades funcionais do microbioma. Essa técnica permite não apenas a descoberta de novas funções enzimáticas, microrganismos e genes úteis para biorremediação, mas também melhora a compreensão das interações entre hospedeiros e patógenos. Ademais, a metagenômica pavimenta o caminho para a criação de novas abordagens terapêuticas para doenças humanas (Vázquez-Castellanos et al., 2014).

Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na amazônia brasileira.

No perfil do gene 16S rRNA, as sequências brutas são filtradas para eliminar artefatos de sequenciamento. As sequências semelhantes são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) ou filotipos, que servem como rótulos para grupos de bactérias relacionadas. As contagens de OTUs são organizadas em tabelas que mostram suas abundâncias relativas em cada amostra. Em seguida, são comparadas com um banco de dados de sequências ribossômicas de referência para atribuir a classificação taxonômica. Na fase final, os dados são usados para quantificar a diversidade populacional nas amostras (Bikel et al., 2015).

Em metodologias *shotgun*, são realizadas análises metagenômicas, metatranscriptômicas e virômicas. Na metagenômica, sequências de DNA são mapeadas para genomas ou genes de referência ou usadas na montagem de novos genomas, avaliando a abundância relativa e o potencial funcional das sequências com base em bancos de dados funcionais anotados (**Figura 10**) (Bikel et al., 2015).

Em conclusão, o sequenciamento metagenômico e as metodologias associadas oferecem uma visão detalhada e multifacetada do microbioma. Ao analisar as capacidades funcionais, essas técnicas não apenas revelam novas funções enzimáticas e microrganismos com potencial para biorremediação, mas também aprofundam a compreensão das interações complexas entre hospedeiros e patógenos. Assim, essas ferramentas avançadas não só ampliam nosso conhecimento sobre o microbioma, mas também abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e a melhoria da saúde humana.

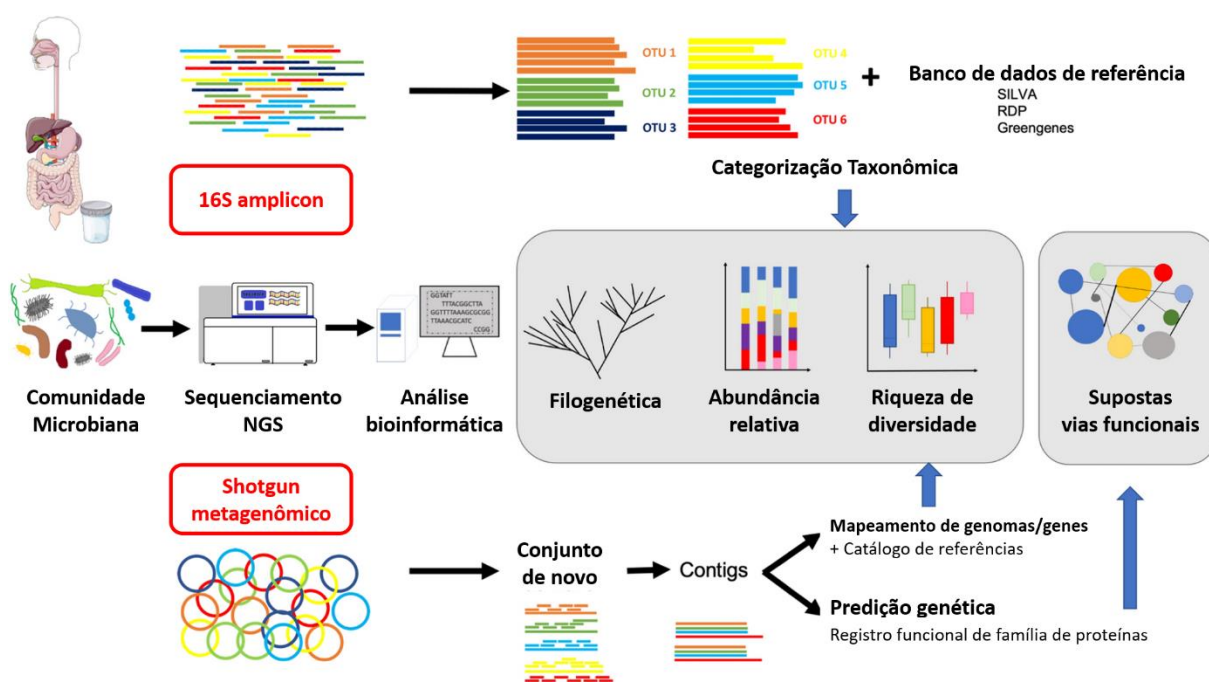


FIGURA 10: Representação esquemática dos diversos métodos de sequenciamento de nova geração (NGS) utilizados para a avaliação da microbiota intestinal.

Fonte: Adaptado de (Szychowiak et al., 2022).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer colorretal (CCR) é o segundo tipo de tumor mais letal em homens e mulheres, afetando principalmente indivíduos acima de 45 anos ou com histórico familiar da doença. No Brasil, são registrados aproximadamente 40 mil novos casos anualmente. Exames endoscópicos, como colonoscopia e retossigmoidoscopia, desempenham papel fundamental no diagnóstico precoce e no manejo terapêutico do CCR.

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, uma proporção significativa dos casos de CCR ainda é identificada em estágios avançados, especialmente na região Amazônica. Essa realidade está associada, em grande parte, à ausência de manifestações clínicas específicas nas fases iniciais da doença e à limitada disponibilidade de métodos de rastreamento eficazes e acessíveis na rede pública de saúde. Além disso, observa-se uma escassez de estudos voltados à caracterização do CCR na população amazônica, o que resulta em um conhecimento restrito acerca dos perfis sociodemográfico, clínico, molecular e microbiológico dos indivíduos acometidos.

A carcinogênese colorretal é um processo complexo, associado a múltiplas alterações moleculares somáticas e influenciado por fatores ambientais, dietéticos e microbiológicos. A inflamação crônica tem sido identificada como um importante fator de risco, destacando-se o papel de *Fusobacterium nucleatum* na ativação de respostas inflamatórias e sua relevância no desenvolvimento do CCR. No entanto, persistem lacunas significativas no entendimento de como esses fatores microbiológicos e inflamatórios impactam especificamente os pacientes da região amazônica.

Diante dessa necessidade de dados locais e robustos, este estudo buscou aprofundar o conhecimento sobre o perfil da microbiota intestinal de pacientes com CCR atendidos na Fundação CECON, investigando possíveis relações com a progressão da doença. Amostras fecais e de sangue periférico foram analisadas, com ênfase na quantificação de citocinas inflamatórias como potenciais biomarcadores.

Os dados obtidos do estudo, ainda não publicados, têm potencial para contribuir significativamente para a compreensão do papel da microbiota na carcinogênese colorretal na região Norte do Brasil, fornecendo subsídios para estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamentos personalizados voltados à população atendida no Amazonas. Ademais, os resultados reforçaram a necessidade de estudos futuros para validação de biomarcadores, ampliação do conhecimento sobre as interações hospedeiro-microbiota e desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Descrever o perfil da microbiota intestinal e dos mediadores imunológicos solúveis em pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na Amazônia brasileira.

4.2 Objetivos Específicos

- A.** Caracterizar o perfil sociodemográfico, epidemiológico e clínico dos participantes do estudo;
- B.** Descrever a composição da microbiota intestinal de pacientes com câncer colorretal;
- C.** Relacionar o perfil da microbiota com a lateralidade do tumor e o prognóstico da doença após um ano de tratamento;
- D.** Quantificar os níveis de mediadores imunológicos solúveis nas amostras de sangue dos participantes do estudo antes do tratamento;
- E.** Investigar a associação dos níveis de mediadores imunológicos solúveis com a microbiota intestinal.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e retrospectivo com abordagem quantitativa. O objetivo foi caracterizar os perfis sociodemográfico, clínico, epidemiológico, bem como descrever os mediadores imunológicos solúveis e a microbiota intestinal de pacientes com diagnóstico confirmado de câncer colorretal (CCR) tratados na Fundação CECON.

5.2 Desenho do estudo, população do estudo e locais de execução

O estudo foi realizado na Fundação Centro de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), uma instituição de referência em oncologia para o Amazonas e toda a região norte do país. Localizada na Rua Francisco Orellana, nº 215, Planalto, Manaus - AM, CEP: 69040-010. A FCECON desempenha um papel crucial no diagnóstico e tratamento do câncer, abrangendo toda a Amazônia Ocidental. Além disso, a instituição está envolvida em atividades de prevenção, ensino e pesquisa.

Este projeto é um desdobramento de estudo maior do mesmo grupo de pesquisa intitulado "Análise do Espectro Molecular e Clínico do Câncer Colorretal: Da Epidemiologia e Qualidade de Vida à Genética e Análises Ômicas", aprovado pelo CEP/FCECON, com o número de CAAE: 52343821.2.0000.0004 e Número do Parecer: 5.180.654 (ANEXO I). Este estudo recebeu financiamento dos programas "AMAZÔNIDAS – MULHERES E MENINAS NA CIÊNCIA" e "PRO-ESTADO" da FAPEAM, estabelecidos pelo grupo de pesquisa da orientadora, em colaboração com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) e o A. C. Camargo Cancer Center.

5.3 Amostragem

Considerando a média atual de novos casos diagnosticados com CCR na FCECON, os dados do relatório de gestão, são registrados aproximadamente 95 novos casos por ano. Para este estudo, estimou-se uma frequência de 20 casos de Câncer Colorretal de Lateralidade Direita (CCRLD) (CID C18 – C18.4) e 40 casos de Câncer Colorretal de Lateralidade Esquerda (CCRLE) (CID C18.5 – C20). Foram incluídos 60 casos diagnosticados de adenocarcinoma colorretal, selecionados por amostragem por conveniência, com base na lateralidade do tumor primário. Destes, 11 casos correspondiam a CCRLD e 49 casos a CCRLE. Os pacientes foram recrutados de forma contínua, por demanda espontânea, no ambulatório oncológico da instituição, no período de novembro de 2021 a fevereiro de 2025.

5.4 Critérios de elegibilidade

5.4.1 Critérios de inclusão

- Indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, oriundos dos Estados da Amazônia Legal.
- Diagnosticados histopatologicamente com adenocarcinoma colorretal em qualquer estágio clínico, com os seguintes CIDs: **C18** – Neoplasia maligna do cólon; **C19** – Neoplasia maligna da junção retossigmoide; **C20** – Neoplasia maligna do reto.
- Pacientes sem tratamento prévio (quimioterapia, radioterapia ou cirurgia).

5.4.2 Critérios de exclusão

- Pacientes sem diagnóstico histopatológico compatível com adenocarcinoma colorretal;
- Pacientes que tiveram amostras insuficientes para realização da pesquisa;
- Pacientes com informações incompletas no prontuário, impedindo a caracterização clínica da doença.

5.5 Métodos a serem aplicados e materiais a serem utilizados

5.5.1 Abordagem aos pacientes

Todos os pacientes elegíveis foram abordados durante a consulta ambulatorial de rotina no serviço de cirurgia oncológica (antes do procedimento cirúrgico) ou no serviço de endoscopia da FCECON. As abordagens ocorreram em uma sala reservada, onde foram realizadas a entrevista e a explanação sobre a pesquisa e foram fornecidas as devidas orientações sobre o estudo e seus objetivos, além de os pacientes terem sido convidados a participar do mesmo.

Ao concordarem com os termos do estudo, os pacientes receberam orientação referente à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em seguida, com a utilização de um questionário padrão (**APÊNDICE II**), foram coletadas informações sociodemográficas e epidemiológicas sobre os fatores de risco e os determinantes de saúde relacionados ao CCR. Da mesma forma, foram coletados dados clínicos e características da lesão durante o tratamento da doença, através da consulta de prontuários dos pacientes.

5.5.2 Coleta e conservação de amostras biológicas

De acordo com o atendimento dos pacientes no serviço ambulatorial da FCECON, e após o consentimento livre e esclarecido dos pacientes, mediante a assinatura do TCLE, precedeu-se à coleta de material biológico (sangue total) com a finalidade de quantificação de Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na amazônia brasileira.

citocinas. Paralelamente, foi entregue aos pacientes um kit de coleta de amostra fecal, acompanhado de instruções detalhadas previamente fornecidas, visando à análise da composição da microbiota intestinal.

Todos resultados obtidos serão disponibilizados aos participantes e aos médicos oncologistas responsáveis, assim que todas as análises forem finalizadas. As normas para a operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado estão descritas no Termo de Composição do Biorrepositório (**APÊNDICE III**).

O procedimento de coleta de material biológico está descrito a seguir:

1. Coleta das mostras de sangue periférico

Após o atendimento ambulatorial dos pacientes, foi realizada a coleta do volume de sangue total necessário para as análises do estudo. O procedimento seguiu as técnicas estabelecidas nos protocolos de segurança do paciente, onde foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA (tubo PPT: Plasm Preparations Tube). Após a coleta, foi realizada uma centrifugação por 10 min. a 3500 RPM, dentro do prazo máximo de 2 horas após a coleta. Em seguida, o soro foi aliquotado e armazenado em freezer -80°C, conforme detalhado no Apêndice IV.

2. Coleta de material fecal

O participante recebeu instruções para coletar uma amostra fecal utilizando um kit que inclui um frasco plástico estéril (tubo Falcon) contendo 2 mL de solução conservante de DNA e RNA (*Zymo Research*®), um swab para a coleta e um protetor para o assento sanitário (*ColOFF*®), para evitar a contaminação ambiental do microbioma (**Figura 11 - A**). Após coletar uma pequena amostra de fezes frescas (2 a 5g) com o swab, o material foi transferido para o tubo Falcon com a solução conservante e entregue à equipe de pesquisa no dia dos exames pré-operatórios ou na enfermaria, antes de qualquer procedimento cirúrgico ou endoscópico (**Figura 11 - B**). A amostra foi levada ao Laboratório de Biologia Molecular da FCECON, onde foi devidamente identificada e armazenada a -80°C.

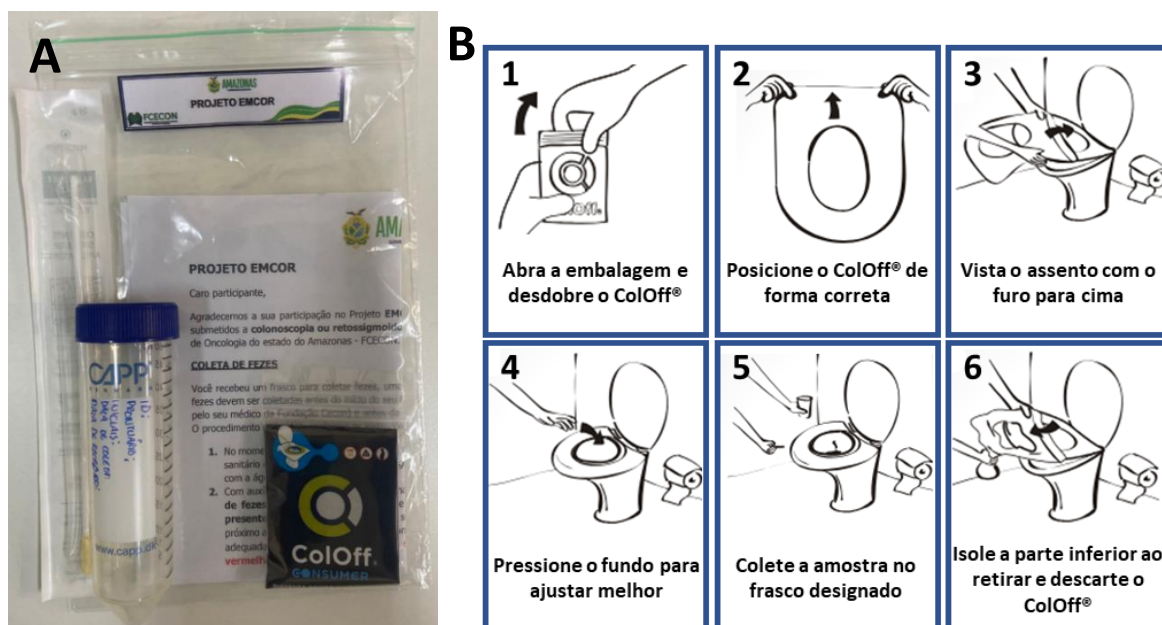


FIGURA 11: Kit fornecido pela equipe de pesquisa para a coleta de amostras de fezes.

Fonte: A – Arquivo pessoal; B – Adaptado de Coloff® (“ColOff”, 2019)

5.5.3 Caracterização dos mediadores imunológicos solúveis

As citocinas avaliadas, foram: Interleucina 1 beta (**IL-1 β**), Interleucina 2 (**IL-2**), Interleucina 4 (**IL-4**), Interleucina 6 (**IL-6**), Interleucina 8 (**IL-8**), Interleucina 10 (**IL-10**), Fator de Necrose Tumoral (**TNF**), Interferon gama (**IFN- γ**), Interleucina 12p70 (**IL-12p70**) e Interleucina 17A (**IL-17A**). A caracterização do perfil dessas citocinas no sangue periférico foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo. As amostras destinadas para à análise das foram inicialmente armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular da FCECON e, em seguida, transportadas para o Laboratório LABGEN 2 da FHEMOAM, onde foram processadas e quantificadas conforme o workflow esquematizado na **Figura 12**.

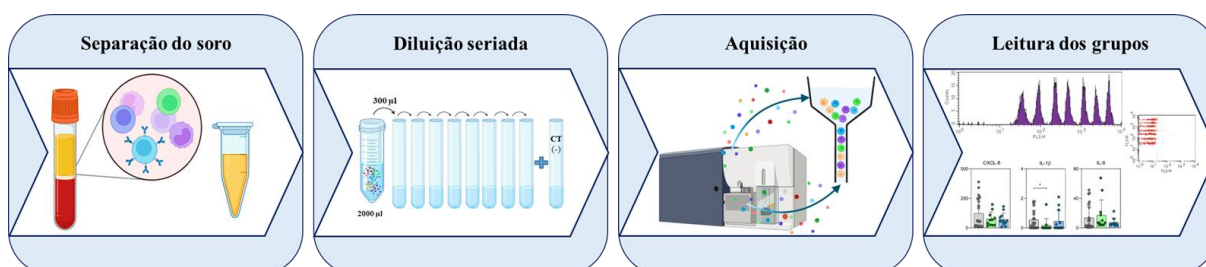


FIGURA 12: Etapas para quantificação de citocinas por citometria de fluxo.

Fonte: Adaptado de BD Cytometric Bead Array – CBA

Os níveis de citocinas foram quantificados utilizando-se o citômetro de fluxo *FACSCanto®II* e o software FCAP-Array v3.0.1 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), o kit de citocinas inflamatórias humanas BD Cytometric Bead Array – CBA (*BD™ Human*

Inflammatory Cytokines) e do kit *BD™ Human Cytokine Th1/Th2/Th17* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Essa abordagem permitiu a análise simultânea de múltiplas citocinas de interesse em um único ensaio, utilizando pequenos volumes de amostra (o protocolo de quantificação das citocinas pelo método CBA segue descrito no **APÊNDICE V**). Utilizou-se misturas de matrizes de esferas citométricas de poliestireno, com intensidades de fluorescência distintas e específicas, revestidas com anticorpos específicos para as citocinas humanas (**FIGURA 13**).

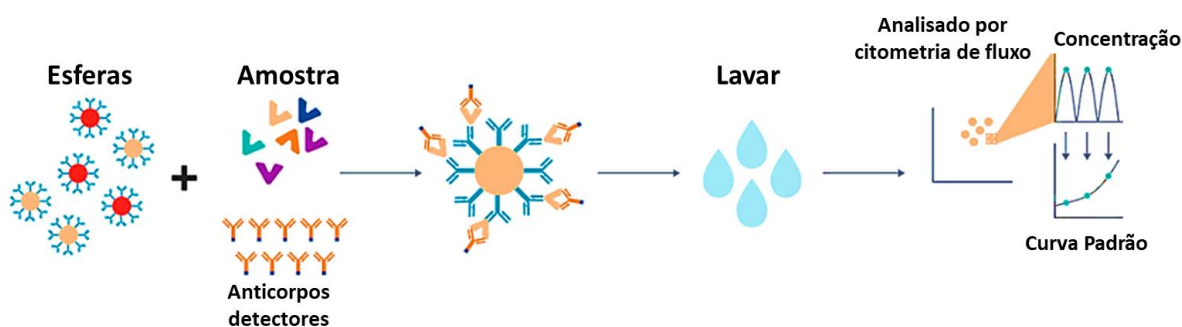


FIGURA 13: Visão geral da análise BD® CBA.

Fonte: Adaptado de BD Cytometric Bead Array – CBA

Para cada citocina avaliada, os dados foram apresentados em concentrações de picogramas por mililitro (pg/mL), conforme as curvas padrão fornecidas no kit e com a intensidade média de fluorescência (MFI), calculadas com o auxílio do software *FCAP-Array v3.0.1*. Os resultados foram analisados utilizando o *GraphPad Prism, v8.0.1* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e submetidos a testes não paramétricos como *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*, considerando-se significância estatística para valores se $p < 0,05$, conforme as recomendações.

5.5.4 Análise da microbiota intestinal

5.5.4.1 Processamento das amostras de fezes

O DNA genômico da microbiota das amostras de fezes foi extraído utilizando o *EXTRACTA® KIT MPTA-PV96-B MDx*, seguindo rigorosamente o protocolo padronizado fornecido pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi cuidadosamente armazenado em um freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na FCECON, garantindo a preservação da integridade e estabilidade das amostras para análises subsequentes. Todo procedimento, detalhado no **APÊNDICE V**, incluiu etapas e condições específicas para assegurar a qualidade e a confiabilidade dos dados obtidos, sendo executado conforme padrões estabelecidos e com monitoramento contínuo do processamento e conservação das amostras ao longo do estudo. O fluxograma do processamento das amostras até o sequenciamento é apresentado na **Figura 14**.

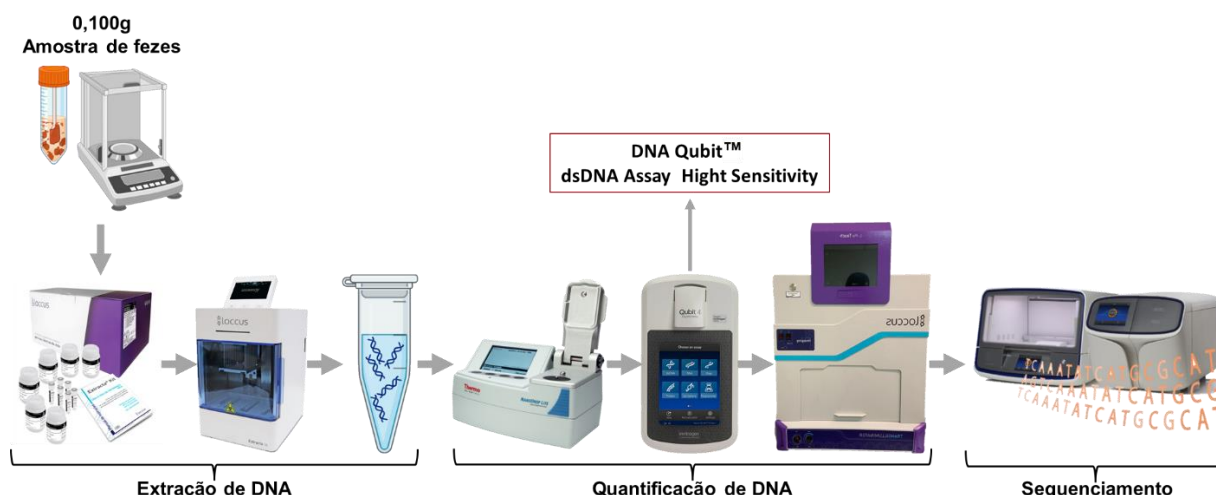


FIGURA 14: Fluxograma das etapas do processamento das amostras de fezes.

Fonte: O autor.

Antes do armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, as amostras de DNA extraídas foram quantificadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop Lite™ (*Thermo Scientific*™, 840281500), conforme as recomendações técnicas do fabricante. Em seguida, foi-se realizada também, uma quantificação por fluorimetria, empregando o aparelho Qubit™ Fluorometer 4.0 (*Invitrogen*, Q33238) em conjunto com o kit *Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kits - High Sensitivity* (*Invitrogen*, Q32851), seguindo o protocolo do fabricante. Para o preparo da solução de trabalho, o reagente Qubit™ dsDNA Assay HS foi diluído na proporção 1:200 em tampão do kit, sendo utilizado volume suficiente para a preparação dos dois padrões e as amostras analisadas.

As soluções resultantes foram homogeneizadas em vórtex por aproximadamente três segundos e incubadas em temperatura ambiente por dois minutos antes da leitura no fluorímetro. A concentração final do DNA foi determinada automaticamente pelo equipamento, de acordo com a fórmula, e expressa em $\text{ng}/\mu\text{L}$: $C = QF * 10^{-1}$. Em que **C** representa a concentração estoque ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e **QF** corresponde à concentração obtida pelo Qubit™ ($\text{ng}/\mu\text{L}$).

5.5.4.2 Sequenciamento de nova geração (NGS)

A caracterização da microbiota intestinal foi realizada por meio da amplificação do domínio V3 e V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), conforme apresentados no **Quadro 03**. A amplificação foi conduzida em reações de PCR com condições termocíclicas otimizadas para garantir especificidade e rendimento adequados, incluindo ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. As amostras amplificadas foram posteriormente verificadas quanto à integridade e

tamanho esperado do produto por eletroforese em gel de agarose, antes do sequenciamento de nova geração. Essa abordagem permitiu a captura de uma ampla diversidade bacteriana, sendo adequada para análises comparativas da composição da microbiota intestinal entre os participantes do estudo.

QUADRO 03: *Primers* sintetizados para sequenciamento.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
806R_trP1_rev	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTACHVGGGTWTCTAAT
515F_A_for_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC04	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC05	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC06	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC07	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC08	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCGATAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC09	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTCGAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATTCGTGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
515F_A_for_BC20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

Todos os procedimentos seguiram o protocolo *Ion Amplicon Library Preparation - Fusion Method* (ThermoFisher Scientific) (**Figura 15**). Esse método foi empregado para preparar bibliotecas de DNA para sequenciamento nas plataformas da *Ion Torrent* e é especialmente adequado para a amplificação de regiões específicas do genoma, conhecidas como *amplicons*, que foram sequenciadas para análise genética.



FIGURA 15: Etapas para análise da microbiota intestinal por sequenciamento NGS.

Fonte: O autor. Adaptado de *Ion Amplicon Library Preparation (Fusion Method)*.

- **Amplificação de sequências-alvo**

Para a amplificação das sequências-alvo, foram utilizados 45µL do *Platinum PCR Super Mix High Fidelity*, de 20-50ng de DNA genômico e 1µL da solução estoque de primer a 10 µM, obtendo um volume total de 50 µL. A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação 94 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 segundos, anelamento 58 °C por 30 segundos, extensão 68 °C por 1 minuto e mantidos a 4 °C.

- **Purificação da biblioteca**

Para purificar a biblioteca, foram adicionados 90 µL do reagente Agencourt® AMPure® XP Reagent a cada tubo contendo o *amplicon*, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram colocados em uma estante magnética por 2 minutos ou até a solução ficasse límpida. Os sobrenadantes foram removidos cuidadosamente, e foram adicionados 500 µL de etanol 70%, com uma nova incubação de 30 segundos. Ao final, o etanol foi descartado sem que os sedimentos se desprendessem, e o processo foi repetido para realizar duas lavagens.

Após a lavagem, os tubos foram centrifugados rapidamente e reposicionados na estante magnética para a remoção do sobrenadante remanescente. Posteriormente, foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para secagem das beads. Em seguida, foram adicionados 40 µL de tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), homogeneizados com pipeta (**up and down**) e agitados por 10 segundos no vórtex e incubadas por 1 minuto. O sobrenadante contendo o DNA eluído foi transferido para novo microtubo de 1,5 mL, evitando a dissolução dos sedimentos.

- **Preparo do Pool equimolar das bibliotecas amplificadas**

Para garantir cobertura igualitária das regiões-alvos, as amostras foram agrupadas em quantidades equimolares. Cada biblioteca foi quantificada por fluorometria no equipamento Qubit™ Fluorometer 4.0 (Invitrogen, Q33238) utilizando o kit Qubit™ dsDNA HS Assay, e avaliadas com o equipamento Agilent Bioanalyzer® 2100 e o Kit Agilent Chip DNA 1000.

- **Index PCR, purificação, montagem da biblioteca e sequenciamento**

Foram adicionados a cada amostras os indexes através da etapa de Index utilizando o kit *Nextera XT Library prep* (Illumina, San Diego, CA, USA), conforme instruções do protocolo (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina). Uma segunda amplificação por PCR foi executada para inclusão dos iniciadores de indexação duplos e adaptadores de sequenciamento aos produtos de PCR purificados. Essa segunda amplificação foi realizada com 5µL de DNA, 5µL de cada *primer Nextera XT* (index 1 e 2), 25µL do mix enzimático *Kapa Hifi HotStart Ready Mix 2x* e 10 µL de água ultrapura, totalizando 50 µL por reação. A reação de Index PCR foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 8 ciclos de amplificação (30s a 95°C, 30s a 55°C, 30s a 70°C), com extensão final por 5 minutos a 72°C. O produto resultante foi purificado novamente com o kit *Agencourt Ampure XP beads*, conforme protocolo.

A preparação geral da biblioteca foi automatizada utilizando o equipamento *Ion Chef System* (Thermo Fisher Scientific) conforme as instruções do fabricante (**Figura 16**). Resumidamente, bibliotecas com barcodes foram geradas a partir de 10 ng de DNA por amostra, utilizando o kit *Ion 530™ – Chef* (Thermo Fisher Scientific). A amplificação clonal das bibliotecas foi empregada por PCR em emulsão utilizando o kit *Ion AmpliSeq IC 200* (Thermo Fisher Scientific). As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no equipamento Ion S5 XL usando um chip Ion 530 e o kit Ion 530 – Chef Kit (Thermo Fisher Scientific). As sequências foram avaliadas no *FastQC v0.11.9* e processadas no *DADA2* com filtros de qualidade correção de erros e remoção de quimeras. As variantes de sequência do amplicon (ASVs) foram geradas e classificadas taxonomicamente usando o banco de dados *SILVA v132*.



FIGURA 16: Workflow do *Ion AmpliSeq Microbiome Health Research Assay* no *Ion GeneStudio S5 System*.
Fonte: Adaptado de Flyer *Ion AmpliSeq Microbiome Health Research Kit* (Thermo Fisher Scientific).

5.5.4.3 Processamento das *reads*

Com o objetivo de determinar o número de *reads* necessárias para garantir a cobertura completa da diversidade bacteriana (saturação), foi realizado o carregamento dos Chips Ion 5S de acordo com os protocolos estabelecidos para preparação das bibliotecas e *template*. A eficiência da clonagem e a deposição das moléculas nos poços do chip foram monitoradas pelo software *Torrent Suite*, permitindo avaliar tanto a porcentagem de poços carregados quanto a qualidade das partículas (**APÊNDICE VII**). Nos chips utilizados, o comprimento médio de leitura variou entre 261 pb e 273 bp, enquanto o comprimento mediano de leitura foi de 292 pb e o carregamento de *Partículas Ion Sphere*TM (ISP) e o número de leituras utilizáveis na biblioteca final foram distribuídos conforme descrito a seguir:

- **CHIP A-** 87% poços carregados, com 46% de *reads* utilizáveis, correspondendo a 15.085.045 leituras;
- **CHIP B-** 89% poços carregados, com 44% de *reads* utilizáveis, correspondendo a 14.964.488 leituras;
- **CHIP C-** 91% poços carregados, com 33% de *reads* utilizáveis, correspondendo a 11.290.83 leituras;
- **CHIP D-** 90% poços carregados, com 38% de *reads* utilizáveis, correspondendo a 13.038.019 leituras;
- **CHIP E-** 88% poços carregados, com 43% de *reads* utilizáveis, correspondendo a 14.364.735 leituras;
- **CHIP F-** 84% poços carregados, com 33% de *reads* utilizáveis, correspondendo a 10.503.630.

Foram observados diferentes perfis de saturação entre as amostras analisadas. Algumas amostras atingiram saturação próxima a 655.977 *reads*, a maioria saturou em torno de 1.174.605 *reads*, enquanto poucas amostras apresentaram saturação igual ou superior a 1.503.829 *reads*. Essa variação pode ser atribuída a fatores como a diversidade microbiana individual entre os participantes, refletindo diferenças na composição e complexidade da microbiota intestinal.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados no Epi-Info v7.2.2.2 (CDC, Atlanta, EUA) e analisados por estatística descritiva. Variáveis qualitativas foram expressas em frequência absoluta (n) e relativa (%), comparadas pelo teste do *Qui-quadrado* ou *exato de Fisher*, e variáveis quantitativas foram apresentadas por média e desvio padrão. Adotou-se nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), margem de erro foi definida em 5% e intervalo de confiabilidade de 95%.

A qualidade das sequências foi avaliada utilizando o *FastQC v0.11.9* (Andrews, 2019), considerando duplicatas, bases ambíguas e necessidade de truncamento. Em seguida, os dados foram processados no *script R* com o *pipeline* do pacote *DADA2* (Callahan et al., 2016). Leituras de baixa qualidade foram filtradas com os seguintes parâmetros: $\text{maxN} = 0$, truncamento de 240 nucleotídeos para leituras forward e 160 para leituras reverse ($\text{truncLen} = 240, 160$), e erros máximos esperados de 2 e 5 para leituras forward e reverse, respectivamente ($\text{maxEE} = 2,5$), seguido de uma correção paramétrica das taxas de erro e a composição das amostras até convergirem. Sequências idênticas foram agrupadas para gerar a tabela de variantes de sequência do amplicon (ASVs), e quimeras removidas para reduzir vieses de PCR. A classificação taxonômica foi realizada com o banco de dados SILVA v132 (Callahan, 2018), resultando na tabela final de composição microbiana. A diversidade alfa foi avaliada por meio do *Índice de Shannon* (Kim et al., 2017) e analisada estatisticamente por ANOVA (análise de variância), enquanto a abundância de filos e gêneros foi comparada pelo teste de *Mann-Whitney*, considerando $p < 0,05$ como parâmetro de significância.

A análise de assinaturas de mediadores consistiu no cálculo da mediana global de cada variável avaliada, utilizada como ponto de corte individual para estratificar os participantes em dois grupos: valores acima ou abaixo do limiar. Para facilitar a visualização das proporções nos gráficos, adotou-se um ponto de corte fixo de 50% na categorização da produção de cada mediador. Diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste exato de *Fisher*. As assinaturas foram representadas em gráficos de dispersão ascendente e mapas de calor, confeccionados no Microsoft Excel. Para identificar parâmetros comuns ou exclusivos entre grupos, utilizou-se Diagrama de Venn <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, ilustrando grupos, interseções e elementos.

Os pontos de corte adotados para os grupos de lateralidade foram: **CXCL8** = 561,06; **IL-1b** = 171,99; **IL-6** = 311,26; **TNF** = 98,60; **IL-12** = 86,37; **IFN-g** = 51,84; **IL-17A** = 48,96; **IL-4** = 90,00; **IL-10** = 137,45; **IL-2** = 269,28. Para estadiamento da doença, os valores foram: **CXCL8** = 549,05; **IL-1b** = 174,20; **IL-6** = 271,95; **TNF** = 99,05; **IL-12** = 86,37; **IFN-g** = 51,84; **IL-17A** = 49,68; **IL-4** = 89,28; **IL-10** = 137,45; **IL-2** = 269,28.

7 ASPÉCTOS ÉTICOS

Este estudo esteve vinculado ao projeto de pesquisa intitulado **“ANÁLISE DO ESPECTRO MOLECULAR E CLÍNICO DO CÂNCER COLORRETAL: DA EPIDEMIOLOGIA E QUALIDADE DE VIDA À GENÉTICA E ANÁLISES ÔMICAS (EMCOR)”**, coordenado pela Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas - FCECON com **CAAE: 52343821.2.0000.0004**, com aprovação no dia 20 de dezembro de 2021 (**Apêndice 15.1**).

O estudo contou com financiamento dos programas **“AMAZÔNIDAS – MULHERES E MENINAS NA CIÊNCIA”** e **“PRO-ESTADO”** da FAPEAM, previamente firmados pelo grupo de pesquisa, além de parcerias institucionais com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) e o A. C. Camargo Cancer Center.

Para fins investigativos, foram utilizados dados clínicos, laboratoriais e dados obtidos de testes moleculares dos participantes. Todas as informações foram tratadas de forma sigilosa e anonimizada durante o desenvolvimento e após a conclusão do estudo. A equipe médica assistencial e os pacientes poderão ter acesso aos resultados das análises durante a consulta médica de acompanhamento. A equipe de pesquisadores do estudo se comprometeu com ampla divulgação dos resultados obtidos, conforme a Resolução 466/2012 e Resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde.

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 Descrição sociodemográfica, clínica-epidemiológica dos participantes do estudo

Entre o período de novembro de 2021 (início das coletas do estudo maior – Projeto EMCOR) e março de 2025, um total de 219 indivíduos com diagnóstico confirmado de adenocarcinoma colorretal foram inicialmente incluídos no estudo. Após a aplicação dos critérios de elegibilidade, 159 participantes foram excluídos por não apresentarem amostras biológicas pareadas (sangue e fezes), indispensáveis para responder os objetivos deste estudo. Dentre os indivíduos elegíveis ($n = 60$), 81,7% foram caracterizados com CCRLE ($n = 49$), dos quais 32 (65,3%) eram do sexo feminino e 17 (34,7%) do sexo masculino. E aqueles participantes que tinham CCRLD, corresponderam a 18,3% ($n = 11$), com predomínio do sexo masculino ($n = 7$; 63,6%) em relação ao feminino ($n = 4$; 36,4%) (**Figura 17**).

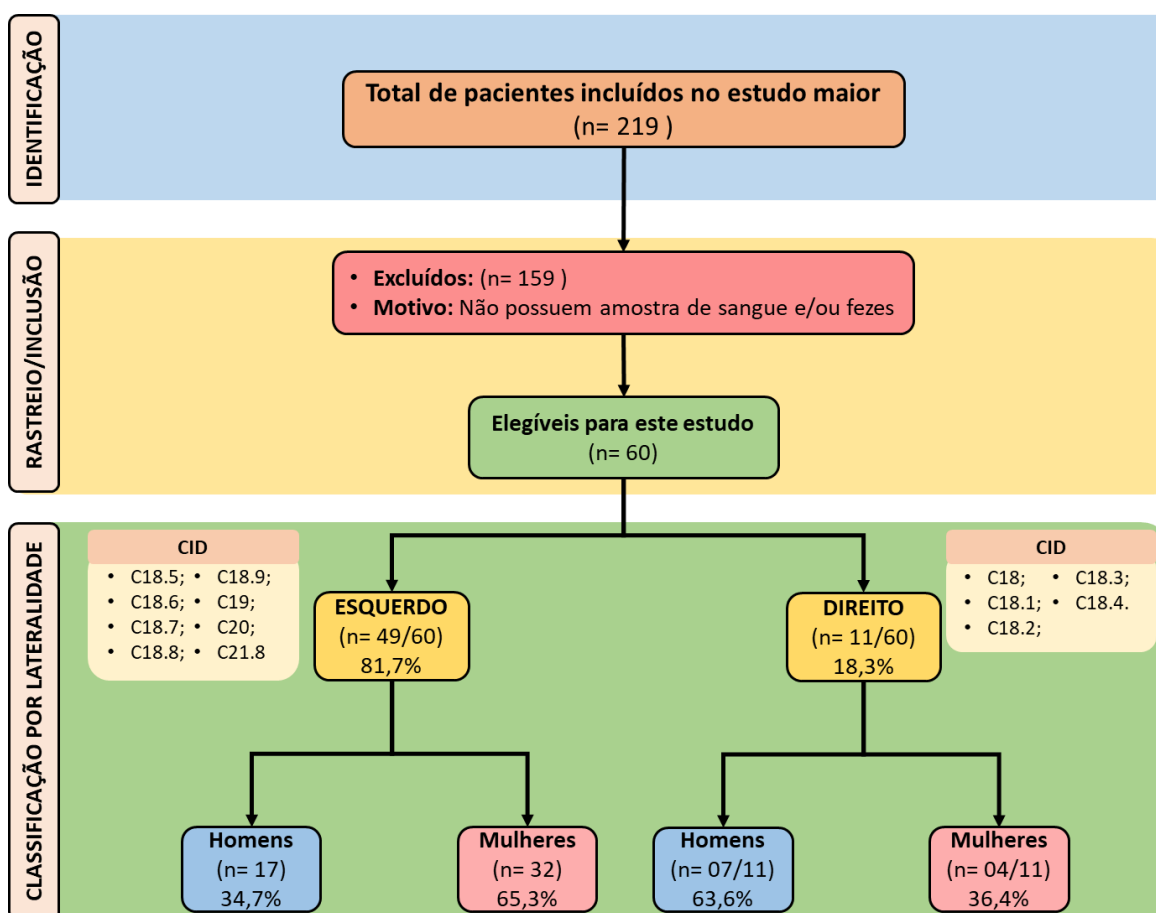


FIGURA 17: Fluxograma da seleção inicial de participantes

Nota: CCRLE= Câncer Colorretal de Lateralidade Esquerda; CCRLD= Câncer Colorretal de Lateralidade Direita. CID= C18 - Neoplasia maligna do cólon/ceco; C18.1 - Neoplasia maligna do apêndice (vermiforme); C18.2 - Neoplasia maligna do cólon ascendente; C18.3 - Neoplasia maligna da flexura (ângulo) hepática(o); C18.4 - Neoplasia maligna do cólon transversal; C18.5 - Neoplasia maligna da flexura (ângulo) esplênica(o); C18.6 - Neoplasia maligna do cólon descendente; C18.7 - Neoplasia maligna do cólon sigmoide; C18.8 - Neoplasia maligna do cólon com lesão invasiva; C18.9 - Neoplasia maligna do cólon, não especificada; C19 - Neoplasia maligna da junção retossigmoide; C20 - Neoplasia Maligna do Reto; C21.8 - Neoplasia maligna do reto, ânus e do canal anal com lesão invasiva.

Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na amazônia brasileira.

A análise do perfil sociodemográfico da população do estudo, revelou uma distribuição heterogênea entre os sexos, com uma predominância de participantes do sexo feminino (n = 36; 60,0%) em comparação com os do sexo masculino (n = 24; 40,0%) (**Tabela 1**). No que diz respeito a distribuição etária, a análise indicou maior frequência de participantes com 66 anos ou mais (n = 28; 46,7%), seguida pela faixa etária de 51 a 65 anos (n = 24; 40,0%) e também se observou a presença de uma parcela jovem abaixo dos 50 anos (n = 8; 13,3%). A idade média dos participantes foi de $65,0 \pm 12,4$ anos, sugerindo um perfil etário predominantemente mais avançado.

Ainda na Tabela 1, no que se refere a etnia, a predominância foi dos indivíduos que se declararam pardos (n = 37; 61,7%). Em relação à procedência geográfica, a maior parte dos participantes era oriunda do estado do Amazonas (n = 38; 63,3%), enquanto 21 (35,0%) provinham de outros estados brasileiros e 1 indivíduo (1,7%) de outro país, evidenciando um predomínio de participantes locais e regionais. Em conjunto, esses dados indicam uma amostragem formada predominantemente por mulheres, de idade avançada, majoritariamente pardas e provenientes do Amazonas, informações relevantes para contextualizar a interpretação de achados clínicos e epidemiológicos do estudo.

Tabela 1: Características sociodemográficas dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON

Participantes do estudo	
[n=60]	
Média de idade, [±DP]	
65,85 [±16,4]	
Distribuição etária, n [%]	
≤ 50	8 [13,33]
51 – 65	24 [40,00]
≥ 66	28 [46,67]
Sexo, n [%]	
Masculino	24 [40,00]
Feminino	36 [60,00]
Etnia^a n [%]	
Amarela	2 [3,33]
Branca	12 [20,00]
Indígena	1 [1,67]
Negra	8 [13,33]
Parda	37 [61,67]
Procedência, n [%]	
Amazonas	38 [63,33]
Outro Estado	21 [35,00]
Outro País	1 [1,67]

^a: autodeclarada

De acordo com o estudo conduzido no Brasil por Remonatto et al. (2024), foram avaliados um total de 310 pacientes diagnosticados com câncer colorretal, sendo 157 mulheres (50,6%) e 153 homens (49,4%), demonstrando uma distribuição de gênero praticamente

equilibrada. A idade média ao diagnóstico foi de 60 anos, com uma amplitude que variou de 18 a 84 anos. Quanto à localização anatômica dos tumores, 68 pacientes apresentaram lesões no cólon direito, 145 no cólon esquerdo e 89 no reto, evidenciando uma maior prevalência de tumores no cólon esquerdo. Em oito casos (2,6%), a localização exata do tumor não foi especificada nos registros clínicos (Remonatto et al., 2024).

Em outro estudo, realizado na China por Chen. B., et al. (2025), os participantes foram divididos em três grupos com base em colonoscopia e biópsia: pacientes com CCR ($n = 104$), indivíduos com lesões colorretais benignas ($n = 138$) e controles saudáveis ($n = 106$). A idade mediana foi de 55 anos (27–75) no grupo CCR, 51 anos (24–77) no grupo benigno e 47 anos (23–67) nos controles. A distribuição por sexo foi relativamente homogênea: 54,8% homens e 45,2% mulheres no CCR; 61,6% e 38,4% no benigno; e 52,8% e 47,2% nos controles. Entre os pacientes com CCR, a localização tumoral foi predominantemente retal (51,9%), seguida pelo cólon (45,2%) (Chen et al., 2025).

A análise dos principais fatores de risco, conforme descrito na **Tabela 2**, evidenciou aspectos importantes sobre a amostragem estudada. Entre os participantes, 39 (65,0%) não apresentaram histórico tabagista e 34 (56,7%) relataram não consumir bebidas alcoólicas. Em relação ao consumo de alimentos industrializados, foi relatado por 30 indivíduos (50,0%), sendo que a maioria dos que consumiam ($n = 27$; 90,0%) o fazia entre 1 a 7 vezes por semana, 2 (6,7%) mais de 7 vezes e 1 (3,3%) não soube informar a frequência. Em relação ao consumo de carne vermelha ou processada, 35 participantes (58,3%) referiram consumo, sendo que 33 (91,4%) consumiam entre 1 a 7 vezes por semana, 1 (2,9%) mais de 7 vezes e 2 (5,7%) não souberam informar. Quanto à carne salgada, 36 indivíduos (60,0%) consumiam regularmente, predominando a frequência de 1 a 7 vezes semanais ($n = 30$; 83,3%), seguida de mais de 7 vezes ($n = 4$; 11,1%) e não souberam informar a frequência 2 (5,6%).

Em relação ao histórico familiar de câncer, 43 indivíduos (71,7%) relataram ocorrência familiar da doença. Quanto às comorbidades, a maioria dos participantes (40; 66,7%) não possuía condições crônicas, enquanto 14 (23,3%) apresentavam hipertensão arterial sistêmica isolada e 6 (10,0%) tinham hipertensão associada ao diabetes mellitus (DM).

Segundo o estudo de Foppa et al., 2021, foram diagnosticados 101 casos de câncer retal esporádico em adolescentes e jovens adultos (2,4% da amostra), com idade média de 33,5 anos. Dentre eles, 51,5% eram homens, 17,8% fumantes, 25,7% apresentavam histórico familiar de CCR e 24,7% eram obesos. A maioria dos diagnósticos (92,1%) ocorreu após o surgimento de sintomas, com intervalo médio de 13,7 meses, sendo o sangramento retal o mais frequente (68,8%) (Foppa et al., 2021).

Em uma revisão, Gupta et al., 2024, destacam que o CCR é influenciado por fatores demográficos, de estilo de vida, da infância, ambientais, genéticos e somáticos, bem como pela interação entre eles. Os autores também ressaltam que a soma das exposições ao longo da vida pode ser representada pelo conceito de expossoma (Gupta et al., 2024), que engloba fatores ambientais e comportamentais, como poluição, dieta, estresse e radiação, buscando compreender seu impacto na saúde e no desenvolvimento de doenças ao longo do tempo.

Tabela 2: Características dos fatores de risco dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON

Participantes do estudo [n=60]	
Tabagismo, n [%]	
Sim	21 [35,00]
Não	39 [65,00]
Etilismo, n [%]	
Sim	26 [43,33]
Não	34 [56,67]
Consumo de alimentos industrializados, n [%]	
Sim	30 [50,00]
Não	30 [50,00]
Frequência semanal entre os que consomem, n [%]	
1 a 7 vezes	27 [90,00]
Mais de 7 vezes	2 [6,67]
Não se informar a frequência	1 [3,33]
Consumo de carne vermelha/processados, n [%]	
Sim	35 [58,33]
Não	25 [41,67]
Frequência semanal entre os que consomem, n [%]	
1 a 7 vezes	33 [94,29]
Mais de 7 vezes	1 [2,86]
Não se informar a frequência	2 [5,71]
Consumo de carne salgada, n [%]	
Sim	36 [60,00]
Não	24 [40,00]
Frequência semanal entre os que consomem, n [%]	
1 a 7 vezes	30 [83,33]
Mais de 7 vezes	4 [11,11]
Não se informar a frequência	2 [5,56]
Histórico familiar de câncer, n [%]	
Sim	43 [71,67]
Não	17 [28,33]
Comorbidades, n [%]	
Nega comorbidades	40 [66,67]
HAS	14 [23,33]
HAS + DM	6 [10,00]

Nota: HAS (Hipertensão arterial sistêmica); DM (Diabetes mellitus).

A **Tabela 3** apresenta a classificação anatomopatológica, estadiamento e condutas terapêuticas da população estudada. Observou-se predominância de lesões localizadas no lado esquerdo, identificadas em 49 indivíduos (81,67%), enquanto a lateralidade direita foi registrada em 11 participantes (18,33%). Quanto à localização primária dos tumores segundo o CID-10, a maioria dos casos ocorreu no reto (C20; n = 25; 41,67%), seguida pelo cólon sigmoide (C21.8; n = 9; 15,0%), cólon direito (C18; n = 10; 16,67%) e cólon descendente (C18.7; n = 7; 11,67%). Outras localizações incluíram cólon transverso (C18.2, C18.4, C18.5, C18.6), cada uma com um caso isolado (n = 1; 1,67%) e cólon sigmoide proximal (C19; n = 5; 8,33%).

Esses achados corroboram dados populacionais prévios, como os relatados por Mangone et al. (2021), entre 2000 e 2012, os quais analisaram 29.358 casos de câncer colorretal na região da Emilia-Romagna, Itália, identificando maior incidência no cólon esquerdo (18.852 casos) em comparação ao lado direito (8.828 casos) e transverso (1.678 casos). Além disso, foram registradas 16.976 mortes (57,8%) e 352 perdas no acompanhamento (1,2%). A conclusão do estudo indica que, embora o CCRLD esteja associado a piores resultados comparado ao CCRLE, essa diferença só se mantém significativa quando ajustada para o histórico de triagem (Mangone et al., 2021).

Complementando essas observações sobre um melhor prognóstico do CCRLE, Baran et al., (2018) evidenciaram, em revisão do estudo CALGB/SWOG 80405, que pacientes com tumores no lado esquerdo tratados com cetuximabe apresentaram sobrevida global mediana de 36 meses, em contraste com 16,7 meses para aqueles com tumores no lado direito, indicando um aumento significativo da mortalidade associada ao CCRLD (Razão de Risco = 1,87; IC 95% = 1,48 - 2,32, $P < 0,0001$) (Baran et al., 2018).

Estudos recentes reforçam a resistência maior do CCRLD à terapia quimioterápica padrão e o benefício específico de agentes bloqueadores de EGFR para tumores do lado esquerdo, especialmente em pacientes *KRAS* selvagem, destacando diferenças terapêuticas e prognósticas importantes entre os sítios tumorais (Aljama et al., 2023). O estudo retrospectivo de Ra, H. (2024), conduzido na Coreia do Sul entre 2005 e 2015 com 1.268 pacientes, mostrou predominância de CCR de lateralidade esquerda (74,9%), sendo o câncer retal (C20; 45,1%) a localização mais frequente, seguido pelo cólon direito (C18; 15,7%), cólon descendente (C18.7; 15,7%) e junção retossigmoide (C19; 9,8%). A ocorrência de CCR de lateralidade esquerda foi aproximadamente três vezes superior à de lateralidade direita (25,1%) reforçando a tendência global de maior incidência de tumores em regiões distais do cólon (Ra et al., 2024).

As diferenças embriológicas do CCRLD e do CCRLE contribuem para variações moleculares, histológicas e prognósticas. O CCRLD origina-se a partir do intestino proximal, enquanto o CCRLE deriva do intestino posterior. Estudos têm demonstrado associações entre fatores de risco carcinogênicos, vias moleculares e mecanismos patogênicos e a localização anatômica do CCR (Baran et al., 2018; Hu et al., 2018). Essas distinções tornam o sítio do tumor clinicamente relevante. De forma consistente com estudos prévios (Gonçalves et al., 2023; Kalantzis et al., 2020; Qaderi et al., 2021), o estudo de Ra, H. (2024) demonstraram que pacientes com CCRLD apresentam maior incidência de anemia e maior frequência de tumores indiferenciados em comparação aos portadores de CCRLE (Ra et al., 2024).

Em relação ao estadiamento clínico, verifica-se uma predominância de pacientes que apresentavam doença em estágios mais avançados Estágios III e IV com 60% dos casos (n = 36), sendo o Estágio III o mais frequente (48,33%), seguido pelo Estágio IV (11,67%). Estágios I e II representaram 33,34% dos casos, e 6,67% não apresentavam informação sobre o estadiamento, o mesmo foi observado por outros autores (Lansom et al., 2024; Ponvilawan et al., 2025). Além disso, 6,67% dos registros não apresentavam informação sobre o estadiamento. Esses achados sugerem que quase aproximadamente 60% dos pacientes foram diagnosticados em fases localmente avançadas ou metastáticas. Em uma coorte conduzida na Tailândia por Ponvilawan et al., (2025), foram incluídos 90 indivíduos para análise, no qual 78% dos participantes foram diagnosticados em estágios avançados (III–IV), com predomínio de tumores primários na região retossigmoide (66%) (Ponvilawan et al., 2025).

A análise das condutas terapêuticas, evidenciou que a estratégia combinada de cirurgia e adjuvância (quimioterapia \pm radioterapia) foi a mais utilizada (n = 34; 56,66%), seguida por cirurgia isolada e a quimioterapia combinada com radioterapia (QT + RT) realizadas em 14 (23,33%). O esquema de QT + RT sem cirurgia ocorreu em 11,67%, enquanto 3 pacientes (5,00%) receberam tratamento paliativo, e 2 (3,33%) não apresentavam registro sobre o tratamento. Em conjunto, os achados refletem protocolos multimodais atuais, ajustados ao estadiamento tumoral, e destacam a complexidade do manejo clínico em pacientes com doença avançada.

Tabela 3: Características da classificação anatomopatológica, estadiamento e condutas terapêuticas dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON

Participantes do estudo	
[n=60]	
Lateralidade, n [%]	
Direita	11 [18,33]
Esquerda	49 [81,67]
Localização primária de acordo com o CID, n [%]	
C18	10 [16,67]
C18.2	1 [1,67]
C18.4	1 [1,67]
C18.5	1 [1,67]
C18.6	1 [1,67]
C18.7	7 [11,67]
C19	5 [8,33]
C20	25 [41,67]
C21.8	9 [15,00]
Estadiamento, n [%]	
Estadio I	4 [6,67]
Estadio II	16 [26,67]
Estadio III	29 [48,33]
Estadio IV	7 [11,67]
Não possui registro	4 [6,67]
Conduta terapêutica, n [%]	
Cirurgia	14 [23,33]
Cirurgia + Adjuvância (QT)	14 [23,33]
Cirurgia + Adjuvância (QT + RT)	20 [33,33]
QT + RT	7 [11,67]
Paliativo	3 [5,00]
Não possui registro	2 [3,33]

8.2 Descrição da composição da microbiota intestinal de pacientes com câncer colorretal

8.2.2 Avaliação da diversidade alfa

A análise da **diversidade alfa** busca avaliar a diversidade presente na comunidade bacteriana de uma amostra individual, considerando dois aspectos principais: a **riqueza**, que corresponde ao número total de espécies observadas, e a **abundância** (frequência), que se refere à distribuição relativa dessas espécies na amostra. Entre os índices mais utilizados para sua avaliação, destacam-se o **Observed** (que avalia exclusivamente a riqueza de bactérias), **Shannon** (que considera tanto a riqueza quanto a abundância, atribuindo maior peso à riqueza), o **Simpson** (que também avalia riqueza e abundância, porém dá maior peso à abundância das espécies) e **Chao1** (que estima a riqueza total considerando também as espécies menos abundantes, ou seja, aquelas identificadas apenas uma ou duas vezes), embora não tenha sido avaliado neste estudo (Cassol; Ibañez; Bustamante, 2025; Fisher; Corbet; Williams, 1943; Shannon, 1948; Simpson, 1949; Willis, 2019).

Na **Figura 18**, a avaliação da diversidade evidencia diferenças entre as amostras, mostrando uma diversidade intrínseca que indica que, embora cada amostra seja relativamente distinta, elas apresentam níveis de diversidade próximos aos observados globalmente. Alguns *outliers* com valores inferiores sugerem variações específicas em indivíduos que possuem uma microbiota menos complexa, possivelmente influenciada por fatores como dieta, idade, estado de saúde ou algum tipo de exposição ambiental. A análise estatística reforçou essas observações, com o índice de *Shannon* apresentando $p = 0,0043$ e o índice de Simpson $p = 0,0035$, indicando diferenças significativas na diversidade microbiana. O elevado grau de modulação observado reflete a heterogeneidade natural da microbiota intestinal humana, que, mesmo entre indivíduos da mesma população, demonstra variações na abundância e distribuição relativa das espécies bacterianas, corroborando a literatura que descreve este ecossistema dinâmico, sugerindo que alterações na diversidade podem ter implicações funcionais relevantes para a saúde (Fusco et al., 2024; Grellier et al., 2024; Li et al., 2023).

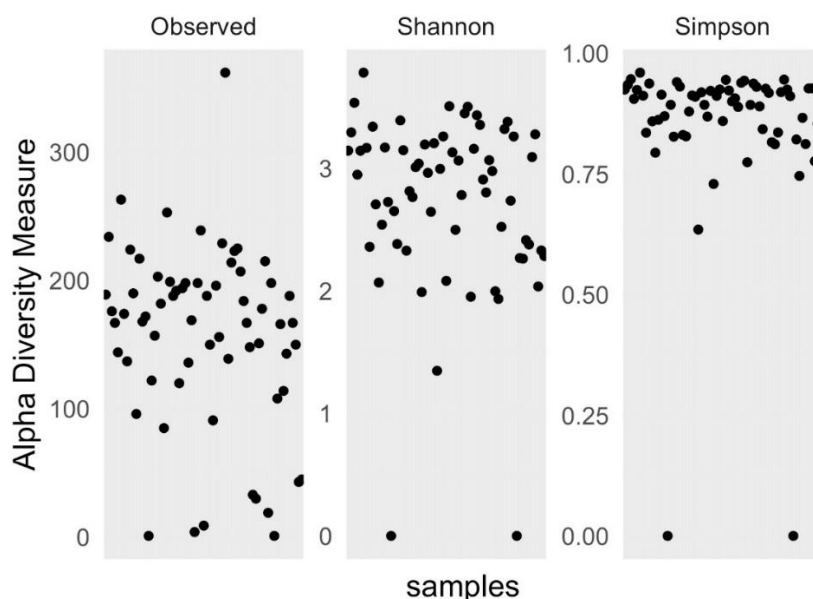


Figura 18: Diversidade alfa da microbiota bacteriana recuperada de amostras fecais de pacientes com CCR, atendidos na FCECON.

De forma integrativa, os resultados obtidos na avaliação da diversidade alfa reforçam a importância de se considerar a variabilidade interindividual na caracterização da microbiota intestinal. A presença de níveis de diversidade relativamente homogêneos, associados à detecção de alguns indivíduos com índices mais baixos, sugere que a estrutura da comunidade bacteriana se mantém funcional na maior parte da população estudada, mas que certos subgrupos podem estar mais suscetíveis a disbiose ou alterações metabólicas relevantes.

Esse achado é particularmente significativo com contexto câncer colorretal, pois estudos têm associado a redução da diversidade microbiana a processos inflamatórios crônicos e ao aumento do risco de desenvolvimento e progressão tumoral (Fernandes et al., 2024; García Menéndez et al., 2024; Yoo et al., 2020). Assim, a análise da diversidade não apenas permite descrever o estado ecológico das amostras, mas também fornece informações valiosas para futuras investigações sobre o papel de perfis microbianos específicos na modulação da resposta imune e no prognóstico clínico. Ademais, como apontado na literatura, a microbiota intestinal contribui ativamente para a patogênese de várias doenças por meio de interações complexas com o metabolismo do hospedeiro e com o sistema imunológico, destacando-se como um potencial alvo para estratégias preventivas e terapêuticas (Yoo et al., 2020).

8.2.3 Avaliação da abundância relativa

A análise das amostras resultou na detecção de 879 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Todas as OTUs listadas apresentaram pelo menos uma leitura em pelo

menos uma amostra, indicando ausência de OTUs com contagem nula no conjunto de dados. O total de leituras obtidas foi de 89.535.032, correspondendo a uma média de aproximadamente 1.377.462 leituras por amostra, o que indica adequada profundidade de sequenciamento. Considerando o número de OTUs, observou-se uma média de ~101.860 leituras por OTU, apontando boa representatividade da diversidade microbiana presente nas amostras.

A **Figura 19** apresenta a distribuição relativa das 20 OTUs mais abundantes nas amostras fecais analisadas, permitindo visualizar o perfil de abundância das principais famílias e gêneros bacterianos da microbiota intestinal. Destaca-se o predomínio de membros da família ***Bacteroidaceae*** (incluindo *Bacteroides dorei*, *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides vulgatus*) e do gênero ***Bacteroides***, associadas ao metabolismo de carboidratos e à modulação imunológica intestinal, que aparecem de forma consistente em praticamente todas as amostras, corroborando o papel dominante destes táxons na microbiota intestinal humana (Baldelli et al., 2021). Destacou-se também a presença de *Faecalibacterium*, especialmente *Faecalibacterium prausnitzii*, importante produtora de butirato, com reconhecidas propriedades anti-inflamatórias e papel na manutenção da integridade da barreira intestinal (Baldelli et al., 2021; Rinninella et al., 2019). Além disso, apareceram membros de *Lachnospiraceae*, *Moraxellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Odoribacter*, *Prevotella* (incluindo *Prevotella copri*), *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Succinivibrionaceae* e *Verrucomicrobiaceae*, que desempenham funções complementares na degradação de polissacarídeos, produção de vitaminas e interação com o sistema imune (Fernandes et al., 2024; Li et al., 2023; Ren et al., 2021). Esses achados ressaltam a ampla diversidade funcional e a heterogeneidade da microbiota intestinal, com variação significativa entre os indivíduos.

Membros das famílias ***Prevotellaceae***, ***Lachnospiraceae*** e ***Ruminococcaceae*** tiveram representatividade marcante, refletindo a diversidade funcional da microbiota e o papel desses grupos na fermentação de polissacarídeos complexos e produção de ácidos graxos de cadeia curta, importantes para a homeostase intestinal (Barot et al., 2024; Pinto et al., 2025; Ren et al., 2021). Recentemente, estudos apontam que membros da família *Verrucomicrobiaceae* podem representar um marcador promissor para melhora de desfechos metabólicos em pacientes obesos; entretanto, seus efeitos a longo prazo sobre inflamação crônica e os potenciais implicações no CCR ainda necessitam de investigação (Niu et al., 2024; Ren et al., 2021).

Em um estudo de rastreamento de CCR em indivíduos com doenças inflamatórias intestinais, Pratt et al. (2022), identificaram uma associação consistente entre o CCR e diversos anaeróbios. Entre os microrganismos destacados estavam *Bacteroides fragilis*, *Clostridium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus spp.*, *Porphyromonas*

spp., *Gemella morbillorum*, *Solobacterium moorei* e *Prevotella intermedia*, detectados tanto em análise de metagenoma fecal quanto em metanálises, evidenciando seu papel na carcinogênese colorretal (Pratt et al., 2022). Tais resultados, estão em consonância com os achados de outros estudos que reportaram o envolvimento desses gêneros bacterianos na iniciação e progressão do CCR (Islam et al., 2022; Lichtenstern; Lamichhane-Khadka, 2023; Liu et al., 2022; Vestby et al., 2020).

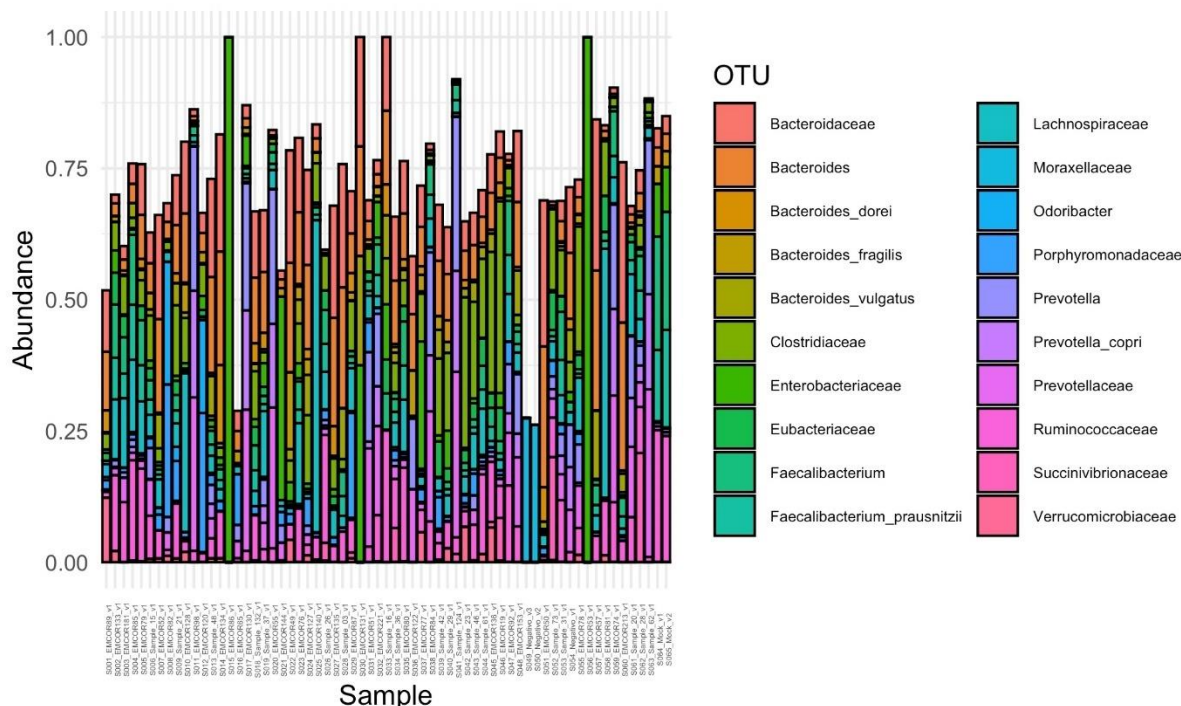


Figura 19: Distribuição da abundância absoluta (log2) das OTUs identificadas nas amostras fecais de pacientes com CCR, atendidos na FCECON.

Em indivíduos saudáveis, a microbiota é predominantemente formada por microorganismos anaeróbios obrigatórios, pertencentes aos filos *Firmicutes* (*Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Eubacteriaceae* e o gênero *Faecalibacterium*) e *Bacteroidetes* e do gênero *Bacteroides* (incluindo espécies como *Bacteroides dorei*, *B. fragilis* e *B. vulgatus*) e, em menor proporção aos filos *Actinobacterias*, *Proteobacteria*. Esses microrganismos desempenham funções metabólicas essenciais, incluindo a degradação de componentes alimentares indigeríveis, a produção de ácidos graxos de cadeia curta, a modulação da resposta imune, a estimulação da renovação das células epiteliais e a manutenção da integridade da mucosa intestinal. Além disso, secretam produtos antimicrobianos e contribuem para o equilíbrio ecológico da microbiota e para a proteção (Lafay; Ancellin, 2015; Netto; Marques, 2024; Song; Chan; Sun, 2020).

Estudos recentes demonstram alterações significativas na composição do microbioma fecal de pacientes com CCR em comparação a indivíduos saudáveis. De forma semelhante ao

observado na doença inflamatória intestinal (DII), a disbiose no CCR é marcada por redução da diversidade alfa, perda de bactérias com potencial anti-inflamatório e aumento de microrganismos oportunistas (Cao et al., 2024, 2024; Nouri et al., 2022; Wong; Yu, 2023). A notável heterogeneidade interindividual observada nas amostras, sugere a influência de múltiplos fatores moduladores, como dieta, uso de medicamentos, condições ambientais ou fisiopatológicas.

A detecção da família *Enterobacteriaceae*, ainda que em baixa abundância em algumas amostras, pode ser considerada um marcador de disbiose. Essa família inclui espécies oportunistas e potencialmente patogênicas, frequentemente associadas a processos inflamatórios e à progressão de doenças intestinais (Baldelli et al., 2021; Rubin; Pitout, 2014). Em DIIs, por exemplo, a disbiose envolve a redução de microrganismos benéficos e o aumento de *Enterobacteriaceae*, grupo que inclui cepas com propriedades pró-inflamatória, como as *Adherent-Invasive Escherichia coli* (AIEC). Essas cepas têm sido implicadas na intensificação da inflamação intestinal, embora o papel específico de cada espécie ainda não esteja totalmente esclarecido, em parte devido às limitações da metagenômica baseada em 16S rRNA, que dificulta a resolução taxonômica em níveis mais específicos (Baldelli et al., 2021).

8.2.3.1 Firmicutes

Neste estudo, verificou-se que aproximadamente 100% dos gêneros bacterianos identificados como diferencialmente abundantes pertenciam ao filo *Firmicutes*, corroborando sua posição como o grupo filogenético mais predominante na microbiota intestinal da população estudada. Os representantes de *Firmicutes*, como *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Eubacteriaceae* e o gênero *Faecalibacterium* (especialmente *F. prausnitzii*), são importantes produtores de butirato, como efeito anti-inflamatório e potencial papel protetor contra a progressão tumoral. A presença abundante desses grupos sugere uma microbiota com potencial de manutenção da homeostase intestinal, embora variações interindividuais possam refletir disbiose em determinados pacientes (Grellier et al., 2024).

A família *Clostridiaceae* é composta por bactérias anaeróbias gram-positivas e formadoras de esporos, amplamente distribuídas dentro do filo *Firmicutes*, sendo uma parte significativa da microbiota intestinal humana. Embora algumas espécies dessa família estejam associadas a infecções intestinais, elas desempenham um papel crucial no metabolismo intestinal, catalisando uma série de reações metabólicas. Entre essas reações, destacam-se o catabolismo de carboidratos complexos e a produção de butirato e acetato. O butirato, produzido principalmente por *Clostridium butyricum* pela via butirato quinase, é um dos

Caracterização da microbiota intestinal e de mediadores imunológicos solúveis de pacientes com câncer colorretal tratados em uma unidade terciária na amazônia brasileira.

principais produtos da fermentação anaeróbia no intestino. Contudo, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do CCR ainda não estão completamente caracterizados (Xu et al., 2023).

Em um estudo recente, Zhang et al. (2023), observaram que a expressão da metiltransferase-like 3 aumentou progressivamente com a evolução do CCR, e que níveis elevados dessa proteína podem promover o desenvolvimento do câncer por meio da transição epitelial-mesenquimal. A superexpressão de metiltransferase-like 3 *in vitro* confirmou esse efeito. Notavelmente, os resultados de experimentos com células e modelos murinos mostraram que *Clostridium butyricum* pode atenuar os efeitos da metiltransferase-like 3 e retardar o progresso do CCR (Zhang et al., 2023).

Além disso, estudos indicam que a família *Lachnospiraceae* pode exercer um efeito inibitório na ocorrência e no desenvolvimento do CCR (Salmon et al., 2012). Metabólitos produzidos pelo microbioma, como o butirato, podem retardar o crescimento do CCR ao inibir o efeito Warburg, enquanto promovem um metabolismo energético favorável (Li et al., 2018; Wang et al., 2019). De acordo com os resultados apresentados por Hexun et al. (2022), a taxa de proliferação das células de CCR mostrou-se inversamente proporcional à abundância relativa de *Lachnospiraceae*, indicando que os metabólitos desta bactéria podem continuar a suprimir a proliferação celular tumoral, mesmo em um ambiente intestinal complexo (Hexun et al., 2022).

A família *Ruminococcaceae* é composta por bactérias anaeróbicas, gram-positivas, e desempenha o papel na fermentação de carboidratos complexos e no metabolismo de fibras alimentares. Embora essas bactérias sejam frequentemente encontradas em probióticos e apresentem benefícios para a integridade da barreira intestinal e a supressão da carcinogênese colônica, há evidências conflitantes na literatura (Centuori; Martinez, 2014; Lee et al., 2013; Pandey et al., 2023). Em um estudo, foi observado uma maior abundância de *Ruminococcaceae* no cólon de camundongos com lesões pré-cancerosas induzidas por 12-dimetilhidrazina (Wei et al., 2010). Outro estudo em camundongos revelou um aumento significativo da *Ruminococcaceae* no grupo com CCR (Richard et al., 2018; Sarhadi et al., 2020; Yang et al., 2019). Porém, uma pesquisa comparando tecidos colônicos normais, pré-cancerosos e cancerosos encontrou maior abundância de *Ruminococcus* nos tecidos normais. Além disso, um estudo demonstrou a diminuição de *Ruminococcus gnavus* em camundongos tratados com azoximetano, que induz inflamação colônica, com uma correlação negativa entre essa bactéria e o número de tumores, mas positiva com células T reguladoras e IL-10 (Alrafas et al., 2020).

As *Eubacteriace*, pertencentes ao gênero *Eubacterium*, são bactérias anaeróbicas gram-positivas com morfologia em bastonete, reconhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias, com estudos demonstrando efeitos anti-inflamatórios reduzidos em modelos murinos eficientes

nas espécies *Faecalibacterium* e *Eubacteriaceae* (Sobhani et al., 2019). Em outro estudo, com foco na identificação de cepas candidatas com atividade anti-CCR, observou-se que *Eubacterium callanderi* apresenta propriedades antiproliferativas contra células de CCR, induzindo apoptose e morte celular de maneira dependente da dose. Além disso, o estudo revelou que a injeção peritumoral de sobrenadante livre de células Eubactérias aumentou as concentrações de butirato e inibiu o crescimento tumoral, destacando o potencial terapêutico dessas bactérias na prevenção do CCR por meio de terapias probióticas (Ryu et al., 2022).

Em termos gerais, a homeostase intestinal é caracterizada pela predominância de membros anaeróbicos obrigatórios do filo *Firmicutes*. No entanto, diversos estudos relatam que, na Doença de Crohn, há redução desses microrganismos e aumento concomitante de *Proteobacteria*, indicando disbiose na microbiota intestinal (Nishino et al., 2018; Yoo et al., 2020).

8.2.3.2 *Bacteroidaceae*

Semelhante ao filo *Firmicutes*, a família *Bacteroidaceae* apresentou níveis elevados de abundância neste estudo, sendo composta predominantemente por bactérias gram-negativas. Essa família possui características fermentativas e é capaz de modular o sistema imunológico de maneira benéfica. Dentro da *Bacteroidaceae*, o gênero *Bacteroides*, incluindo as espécies *Bacteroides dorei*, *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides vulgatus*, estão associados à manutenção da saúde intestinal e à prevenção de doenças. Embora as espécies de *Bacteroides* sejam geralmente mais abundantes, a presença de *Prevotella*, mesmo sendo um gênero altamente diverso, exibe variações composicionais em comparações interindividuais e interpopulacionais do microbioma intestinal humano. As espécies de *Prevotella* no lúmen e intestino posterior são conhecidas por possuírem extensos repertórios de loci de utilização de polissacarídeos e enzimas ativas em carboidratos para metabolismo de vários polissacarídeos vegetais e pode tornar este gênero prevalente em determinados indivíduos (Liang et al., 2019; Prasoodanan P. K. et al., 2021).

8.2.3.3 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* pertence ao filo *Proteobacteria* e é composta por gram-negativas amplamente distribuídas no ambiente, encontrando-se no solo, na água, em plantas e no trato intestinal de animais. A exposição humana a estas bactérias está intrinsecamente relacionada a alterações nos hábitos alimentares e na contaminação de alimento, fator este que desempenha um papel crucial no desenvolvimento de doenças infecciosas (Donaldson; Lee;

Mazmanian, 2016). Esta família inclui várias espécies de grande importância clínica, muitas das quais são reconhecidas como agentes etiológicos de uma gama diversificada de infecções humanas, especialmente as gastrointestinais e sistêmicas. Dentre as principais espécies patogênicas, destacam-se *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* e outros, as quais são frequentemente associadas a infecções intestinais e sistêmicas (Gillespie, 1994; Rubin; Pitout, 2014; Wang; Li, 2023).

Cao et al. (2024), relatam um modelo bacteriano denominado “condutor-passageiro”, no qual bactérias “condutoras”, como as do gênero *Bacteroides* e da família *Enterobacteriaceae*, colonizam o intestino e iniciam a indução da tumorigênese. À medida que o microambiente intestinal sofre alterações/disbiose, essas bactérias condutoras são progressivamente substituídas por bactérias “passageiras”, incluindo patógenos oportunistas e bactérias comensais ou probióticas. Essas mudanças bacterianas subsequente continuam a influenciar e a promover a progressão tumoral (Cao et al., 2024; Tjalsma et al., 2012).

Nas doenças inflamatórias intestinais, é muito comum observar mudanças substanciais nas comunidades microbianas que habitam o lúmen intestinal, destacando-se o aumento da abundância relativa de bactérias facultativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Zhu et al., 2018). Essa família possui características pró-inflamatórias, e seu aumento pode contribuir para o início ou agravamento da resposta inflamatória no hospedeiro (Jalanka et al., 2020).

Entre as espécies da família *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* é uma das mais significativas no contexto das doenças inflamatórias intestinais. Embora seja uma bactéria comensal frequentemente encontrada no trato gastrointestinal de humanos (Allocati et al., 2013; Nouri et al., 2022). A espécie *E. coli* apresenta uma ampla diversidade filogenética, com linhagens bacterianas que possuem diferentes perfis de gene de virulência (Kittana et al., 2018). A patogenicidade de *E. coli* está fortemente associada à sua capacidade de aderir e invadir células epiteliais, além de se multiplicar dentro de macrófagos (Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019).

No contexto da retocolite ulcerativa, induz a morte de células dendríticas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-23. Por outro lado, em pacientes com retocolite exacerbada, *E. coli* pode reduzir a necrose do epitélio intestinal, modulando a produção de espécies reativas de oxigênio, que aceleram a necrose do epitélio (Pilarczyk-Zurek et al., 2016).

8.2.3.4 *Prevotellaceae*

A abundância da família *Prevotellaceae*, gênero *Prevotella* refere-se a um gênero de bactérias que quando seus níveis estão reduzidos, são significativos devido ao seu papel na

produção de mucina, que serve como uma barreira mecânica contra agentes patogênicos. Em um estudo realizado por Hein et al. (2024), a presença de *Prevotellaceae* foi associada a características positivas, como dieta baseadas em vegetais e melhorias (Hein et al., 2024).

Outro estudo, de Xu et al. (2024) encontrou que uma maior abundância de *Prevotellaceae* no CCR está relacionada ao aumento da infiltração imunológica e à maior eficácia da imunoterapia com anti-PD-L. Esse estudo confirma que *Prevotellaceae* pode melhorar a resposta à imunoterapia. Terapias que modulam a microbiota intestinal, como probióticos, surgem como promissoras no tratamento do CCR. No entanto, mais estudos em humanos são necessários para validar esses resultados (Xu et al., 2024).

8.2.4 Análise do mapeamento de assinaturas microbianas em câncer colorretal em pacientes atendidos na Fundação CECON

A **Figura 20** apresentada consiste em um mapa de calor (heatmap) que ilustra o agrupamento hierárquico de amostras com base na abundância relativa de diferentes gêneros e famílias bacterianas. No eixo vertical, estão listados os táxons microbianos, enquanto no eixo horizontal são representadas as amostras, identificadas por códigos específicos. As cores variam em um gradiente do azul ao vermelho, passando pelo amarelo, indicando níveis de abundância relativa padronizados: tons de azul representam valores mais baixos de abundância, próximos de -6 na escala, o amarelo indica valores intermediários próximos de zero, e os tons de laranja a vermelho indicam abundâncias mais elevadas, chegando a valores próximos de 6. A maior parte do mapa apresenta coloração amarela clara, sugerindo predominância de abundâncias próximas à média, enquanto blocos isolados em vermelho e laranja evidenciam táxons com abundâncias significativamente maiores em determinadas amostras.

Notam-se padrões de co-ocorrência, com grupos de bactérias como *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* mostrando concentrações elevadas em subconjuntos específicos de amostras, refletindo possíveis perfis microbianos distintos. As dendrogramas, tanto horizontais quanto verticais, indicam relações hierárquicas entre amostras e táxons, sugerindo similaridade composicional dentro de clusters específicos e diferenciando amostras com perfis microbianos mais heterogêneos. Essa distribuição reflete a existência de perfis microbianos distintos entre os indivíduos analisados, evidenciando possíveis agrupamentos a fatores biológicos, clínicos ou ambientais.

Um desses perfis é caracterizado pelo enriquecimento de *Fusobacterium* e outros gêneros anaeróbios tipicamente associados à mucosa tumoral. O outro perfil mostra predominância relativa de representantes dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, distribuídos em diferentes subconjuntos. Esses padrões sugerem a coexistência de assinaturas microbianas

possivelmente universais associadas ao carcinoma colorretal, concomitantemente a variações regionais e dietéticas características da coorte amazônica. (Berbert et al., 2022; De Carvalho et al., 2019).

A detecção de focos de *Fusobacterium* nas amostras analisadas está em consonância com estudos prévios que descrevem a acumulação desse gênero tanto em tecidos quanto em amostras fecais de pacientes com neoplasia colorretal. A literatura destaca seu papel na modulação do microambiente tumoral, bem como sua associação com pior prognóstico e resistência a terapias (Reis; Da Conceição; Peluzio, 2019; Zhu et al., 2019). Entre os mecanismos implicados, destacam-se a adesão ao epitélio intestinal por meio de proteínas de superfície, a ativação de vias de sinalização pró-oncogênicas e a supressão da resposta imune antitumoral. Tais evidências fornecem base biológica robusta para considerar *Fusobacterium* não apenas como um marcador, mas também como um possível cofator na carcinogênese. A presença deste sinal na Figura 22 sugere que processos semelhantes estão em curso na população amazônica estudada.

De forma complementar, observou-se enriquecimento localizado de membros do gênero *Bacteroides*, com indícios compatíveis com a presença de *Bacteroides fragilis*. Tal achado aponta para a possível contribuição de linhagens enterotoxigênicas (*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis* — ETBF) na promoção tumoral. As toxinas produzidas por essas linhagens são conhecidas por comprometerem a integridade epitelial, induzirem inflamação e favorecerem a proliferação celular (De Carvalho et al., 2019; Thomas et al., 2019). Assim, os dados da Figura 22 reforçam a hipótese de que mecanismos mediados por ETBF estejam atuando em parte da coorte analisada.

A presença pontual de *Prevotella* em determinados agrupamentos deve ser interpretada à luz de variações dietéticas e microambientais. Estudos como os de Berbert et al. (2022) e Kunzmann et al. (2019) demonstram que diferentes cepas desse gênero podem estar associadas a padrões alimentares específicos e a fenótipos inflamatórios diversos (Berbert et al., 2022; Kunzmann et al., 2019). Na coorte amazônica, a detecção de *Prevotella* pode refletir tanto hábitos alimentares regionais quanto possíveis efeitos imunomodulatórios. Portanto, este táxon pode atuar como marcador de exposição dietética e, simultaneamente, como modulador de vias inflamatórias com potencial relevância na carcinogênese.

Em alguns pacientes, foram identificados sinais de expansão de Proteobacteria, particularmente da família Enterobacteriaceae. Este padrão está frequentemente relacionado a estados de inflamação intestinal e alterações no microambiente colônico. A literatura associa a expansão dessas linhagens à disbiose, frequentemente acompanhada por fenótipos oportunistas

e fatores genotóxicos em determinadas cepas (Quaglio et al., 2022b; Thomas et al., 2019). No contexto da Figura 22, a presença pontual dessas famílias fortalece a hipótese de existência de microambientes pró-inflamatórios em subgrupos da população estudada.

Por outro lado, táxons reconhecidamente benéficos, como *Faecalibacterium* e *Roseburia*, produtores de ácidos graxos de cadeia curta (principalmente butirato), apresentaram abundância geralmente baixa a moderada, com poucos picos isolados. A redução relativa dessas populações é compatível com estudos que apontam sua perda como um marcador de diminuição das funções coloprotetoras, aumento da inflamação intestinal e maior suscetibilidade à progressão neoplásica (Berbert et al., 2022; Corrie et al., 2022). Assim, o padrão observado sugere uma possível perda de mecanismos de proteção epitelial, favorecendo a emergência ou manutenção de microrganismos pró-tumorais.

A interpretação integrada dos achados revela um quadro de disbiose heterogênea na coorte amazônica, combinando características descritas em estudos internacionais — como o enriquecimento de *Fusobacterium* e *Bacteroides* enterotoxigênicos — com padrões possivelmente influenciados por fatores regionais, como dieta, ambiente e genética. Por ser a primeira análise com NGS em pacientes com câncer colorretal no Amazonas, os resultados representam uma contribuição inicial relevante para o mapeamento de assinaturas microbianas regionais e para a formulação de hipóteses a serem exploradas em estudos futuros (Berbert et al., 2022; De Souza; Brelaz-de-Castro; Cavalcanti, 2022; Kunzmann et al., 2019).

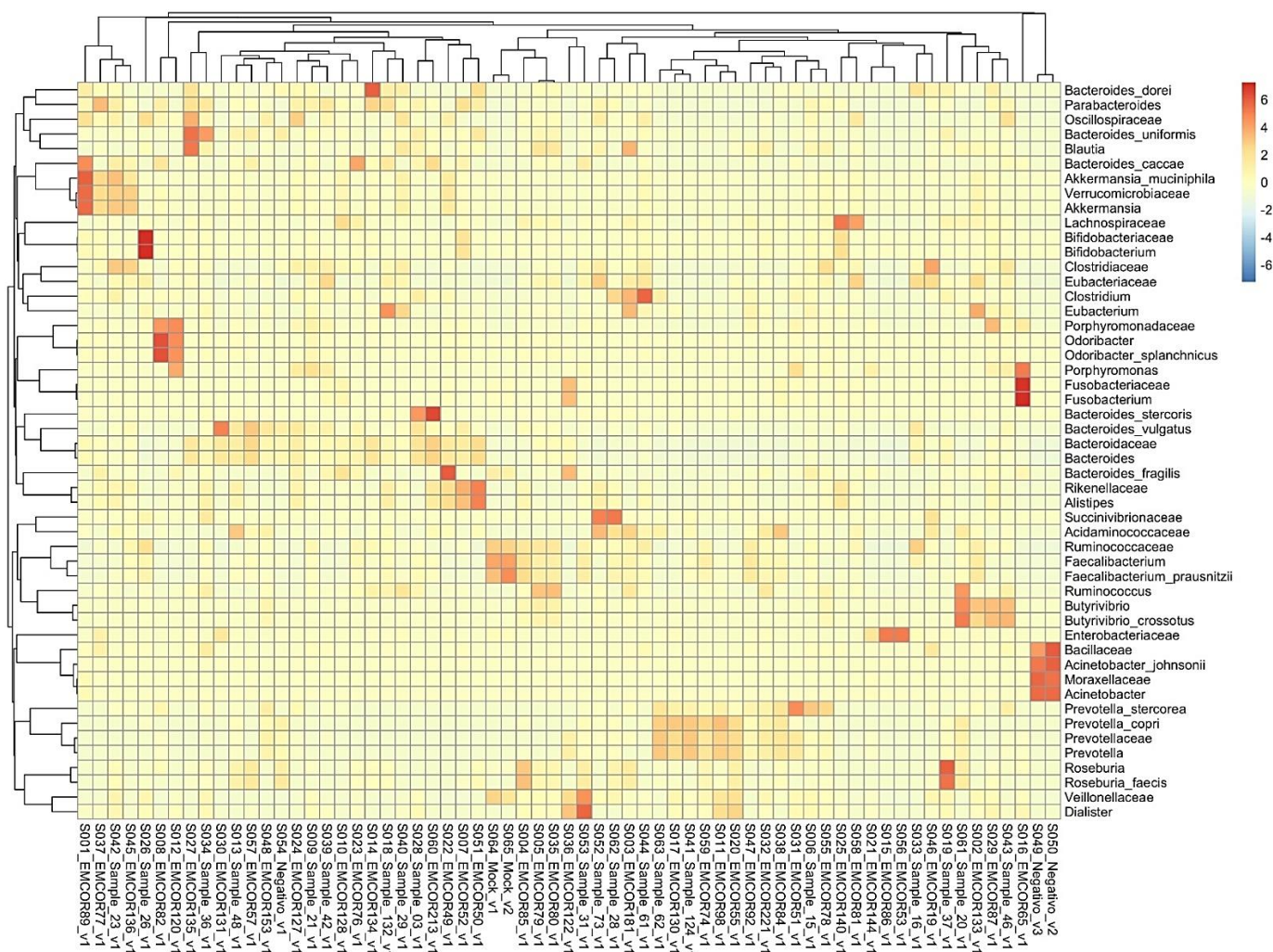


Figura 20: Mapa de calor da abundância relativa de gêneros bacterianos identificados em amostras fecais de pacientes com CCR, atendidos na FCECON.

Legenda: A figura exibe a intensidade da presença de cada gênero bacteriano nas amostras, com cores variando de vermelho (alta abundância) a amarelo (baixa abundância). As amostras estão agrupadas conforme padrões de expressão similares, indicando pelo dendrograma à esquerda e acima da matriz. A variação de cor nas células reflete a abundância relativa de cada gênero bacteriano nas amostras, mostrando uma diversidade na composição microbiota entre os indivíduos analisados.

8.3 Descrição da avaliação dos mediadores imunológicos solúveis

8.3.1 Perfil geral de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença

A **Figura 21** apresenta o perfil dos mediadores imunológicos solúveis da população estudada, considerando a lateralidade tumoral (direita e esquerda) e o estadiamento (I-II e III-IV). Conforme estudos recentes, pacientes com CCRLE tendem a apresentar maior frequência de diagnóstico, bem como admissão em emergência que aqueles com CCRLD, com taxas de 17% (CCRLE) e 8,5% (CCRLD). Observou-se também o predomínio em estágios mais avançados, com 53,6% dos CCRLE no estágio III e 43,6% dos CCRLD no estágio III (Szostek et al., 2025; Yang et al., 2022). A análise por lateralidade e estadiamento torna-se fundamental, pois a localização e extensão do tumor influenciam diretamente o microambiente tumoral e modulam a produção de mediadores pró-inflamatórios e antitumorais. Tumores em estágios avançados tendem a apresentar um perfil mais pró-inflamatório e imunossupressor.

Observou-se aumento significativo das concentrações séricas de CXCL8 ($p = 0,01$) e IL-6 ($p = 0,03$) em pacientes com CCR de lateralidade direita. Em contrapartida, IFN- γ ($p = 0,009$) e IL-2 ($p = 0,007$) apresentaram-se concentrações reduzidas em comparação à lateralidade esquerda. Ao considerar o estadiamento da doença, observou-se um aumento significativo de CXCL8 nos estágios III–IV ($p = 0,04$), enquanto o aumento de IL-6 nesse grupo não alcançou significância estatística. Esse conjunto de achados indicam um microambiente tumoral pró-inflamatório e imunossupressor, favorecendo à progressão neoplásica, a evasão imunológica e a redução de mediadores envolvidos na indução de respostas antitumoral efetora.

Tais achados estão em consonância aos resultados de Bazzichetto et al. (2022), que associaram níveis elevados de IL-8 circulante a pior prognóstico no CRR, incluindo redução de sobrevida global e progressão mais acelerada da doença (Bazzichetto et al., 2022). De forma complementar, Czajka-Francuz et al. (2022), destacam que a CXCL8 desempenha papel central no crescimento tumoral, promovendo angiogênese, proliferação, invasão, migração e sobrevivência de células do CCR, além de induzir a transição epitelial-mesenquimal, favorecendo a evasão imunológica (Czajka-Francuz et al., 2022).

Samadi et al. (2023) destacam a dualidade funcional das citocinas no contexto tumoral: IL-2 e IL-12 potencializam a resposta antitumoral e podem prevenir o crescimento neoplásico, sendo a IL-2 proposta como biomarcador para avaliar a resposta à imunoterapia. Em contraste, IL-6 e IL-17 favorecem um ambiente inflamatório crônico, associado à proliferação celular desregulada e maior potencial de progressão tumoral (Samadi et al., 2023).

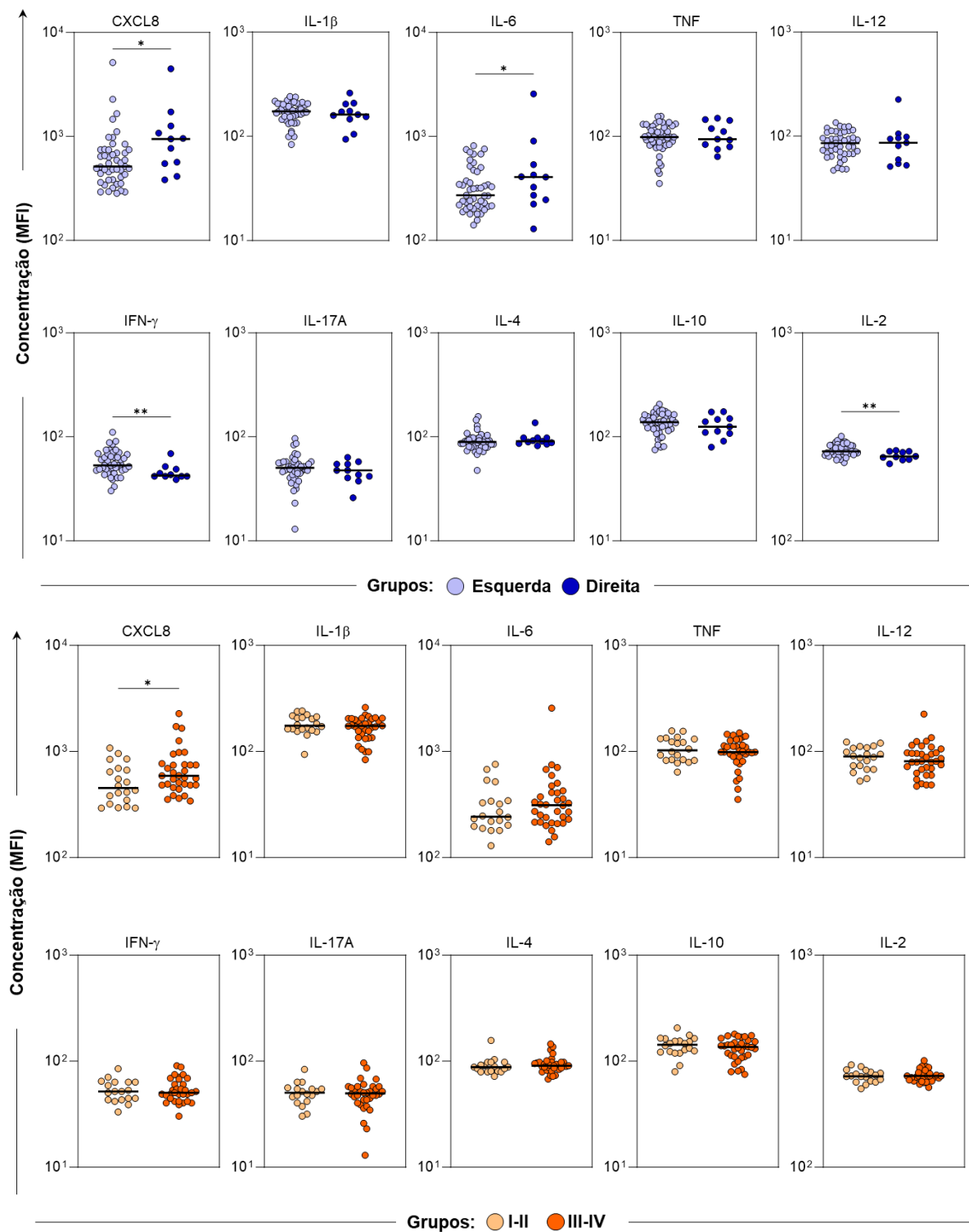


FIGURA 21: Perfil de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença.

Legenda: A figura mostra um panorama geral do perfil de mediadores imunológicos em pacientes de acordo com lateralidade, esquerda (●) e direita (●) e de acordo com o estadiamento da doença, estágios I-II (●) e III-IV (●). Foram utilizados gráficos de dispersão com mediana, os valores foram expressos em intensidade média de fluorescência (MFI), utilizamos a escala logarítmica (Log10) para representar os valores. O teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney. As diferenças significativas ($p < 0,05$) são representadas pelas barras com asteriscos. 0,01* (CXCL8), 0,03* (IL-6), 0,009** (IFN-g), 0,007** (IL-2), para as análises esquerda vs direita. 0,04* (CXCL8) para as análises I-II vs III-IV.

8.3.2 Assinaturas de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e o estadiamento da doença

A análise dos perfis imunológicos, representada nos gráficos e mapas de calor da **Figura 22**, revelou padrões distintos de produção de mediadores inflamatórios quando estratificada pela lateralidade tumoral. Observou-se que pacientes com CCR de lateralidade esquerda apresentaram proporções significativamente maiores de altos produtores de IFN- γ ($p = 0,0001$; 56%), em contraste com a lateralidade direita, onde apenas 18% apresentaram níveis acima da mediana global. Padrão semelhante foi identificado para IL-1 β , com 51% na esquerda ($p = 0,0456$) e 36% na direita. A citocina IL-2 apresentou redução proporcional em ambos os grupos, com 49% na esquerda ($p = 0,0001$) e 18% na direita. Em relação à quimiocina CXCL8, houve diminuição na proporção de produtores na lateralidade esquerda (45%), enquanto a direita apresentou aumento expressivo de 73% ($p = 0,0001$). Embora não tenham sido identificadas diferenças estatisticamente significativas para IL-4, IL-12 e IL-6, as proporções desses mediadores foram superiores na lateralidade direita, sugerindo uma possível polarização do microambiente tumoral em função a localização anatômica do tumor.

Quando estratificados pelo estadiamento clínico, os mediadores analisados evidenciaram variações expressivas entre fases iniciais (I–II) e avançadas (III–IV). IL-12 apresentou aumento significativo na proporção de produtores nos estágios I–II ($p = 0,0335$; 60%), com redução para 44% nos estágios III–IV. Em contraste, a quimiocina CXCL8 apresentou redução no grupo I–II, enquanto no grupo III–IV foi observado aumento para 56% ($p = 0,0035$), padrão também identificado para IL-4 com 39% no grupo I–II e 53% no grupo III–IV ($p = 0,047$). Destaca-se ainda que, nos estágios I–II as citocinas IL-10 e TNF apresentaram proporção elevada de produtores (55% para ambas), assim como nos estágios III–IV para a citocina IL-6 (53%), embora a comparação entre os grupos não tenha revelado diferença estatisticamente significativa.

O diagrama de Venn (**Figura 22**) reforçou essa distinção, evidenciando mediadores específicos para cada grupo, com IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-17A e IL-10 predominando na lateralidade esquerda, enquanto CXCL8, IL-6, IL-12 e IL-4 predominavam na lateralidade direita. Em relação ao estadiamento, nos estágios I–II foram observados TNF, IL-12 e IL-10, ao passo que nos estágios III–IV se destacaram CXCL8, IL-6 e IL-4.

Os indicadores obtidos corroboram a literatura existente a regulação do microambiente inflamatório em CCR. Estudos recentes demonstram que estágios avançados de CCR apresentam predomínio de perfil Th2, evidenciada pelo aumento de IL-4 e IL-10, enquanto em

fases iniciais a elevação dessas citocinas reflete principalmente atividades de células Th2. (Czajka-Francuz et al., 2022). IL-4 e IL-10 podem modular a resposta imune, suprimindo citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , e contribuindo para a imunossupressão local (Vebr et al., 2023). Além disso, níveis elevados de IL-6, IL-12p70, IL-17 e TNF- α tem sido associado a metástases linfonodais, estadiamento TNM e o grau de diferenciação tumoral em pacientes com CCR, sugerindo que a modulação dessas citocinas influencia o prognóstico e pode refletir um estado de imunossupressão com relevância preditiva para a resposta terapêutica (Zheng et al., 2022).

No contexto inflamatório, a IL-1 β e TNF- α apresentam papel consolidado na patogênese da DII e, apesar de existirem indícios de seus efeitos profibróticos, o impacto preciso *in vivo* ainda não está totalmente esclarecido (Yang et al., 2020). No ambiente do CCR, IL-1 β produzida por neutrófilos pode induzir fagócitos mononucleares intestinais a secretar IL-6, promovendo assim a formação de tumores (Li et al., 2020). Além disso, IL-1 β e TNF- α estimulam miofibroblastos subepiteliais colônicos a produzirem colágeno I/IV, CXCL8, proteína quimiotática de monócitos-1 e metaloproteinase de matriz-1, a atuam sobre células endoteliais além disso, seus efeitos alcançam células endoteliais microvasculares intestinais humanas, onde contribuem para processos profibrogênicos por meio da indução da transição endotelial-mesenquimal (Yang et al., 2020).

A IL-8 é fortemente induzida por IL-1 β , TNF- α e LPS, funcionando como um potente quimioatraente na ativação de neutrófilos, processo cuja transcrição é regulada pela via de sinalização NF- κ B. Evidências sugerem que essa citocina exerce papel fundamental na amplificação da resposta inflamatória em DII, sendo a desregulação do eixo IL-8/CXCR1/2 apontada como um dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença (Vebr et al., 2023). Nesse contexto, Gijssbers et al. (2004) investigaram a expressão intestinal das quimiocinas ligantes do CXCR1, CXCL8 e GCP-2/CXCL6, bem como a atuação de células imunocompetentes no processo inflamatório. Os autores identificaram regulação negativa da produção de CXCL8 por leucócitos em casos de doença de Crohn e expressão seletiva de GCP-2/CXCL6 em tecido intestinal inflamado, reforçando a complexidade do papel dessas quimiocinas na modulação da resposta inflamatória intestinal (Gijssbers et al., 2004; Vebr et al., 2023). Já a IL-17 contribui para angiogênese, crescimento tumoral e metástases por indução da via STAT3, além de aumentar os níveis de citocinas e quimiocinas produzidas por células mieloides, remodelando o microambiente tumoral, incluindo alterações da microbiota associada ao CCR (Li et al., 2020).

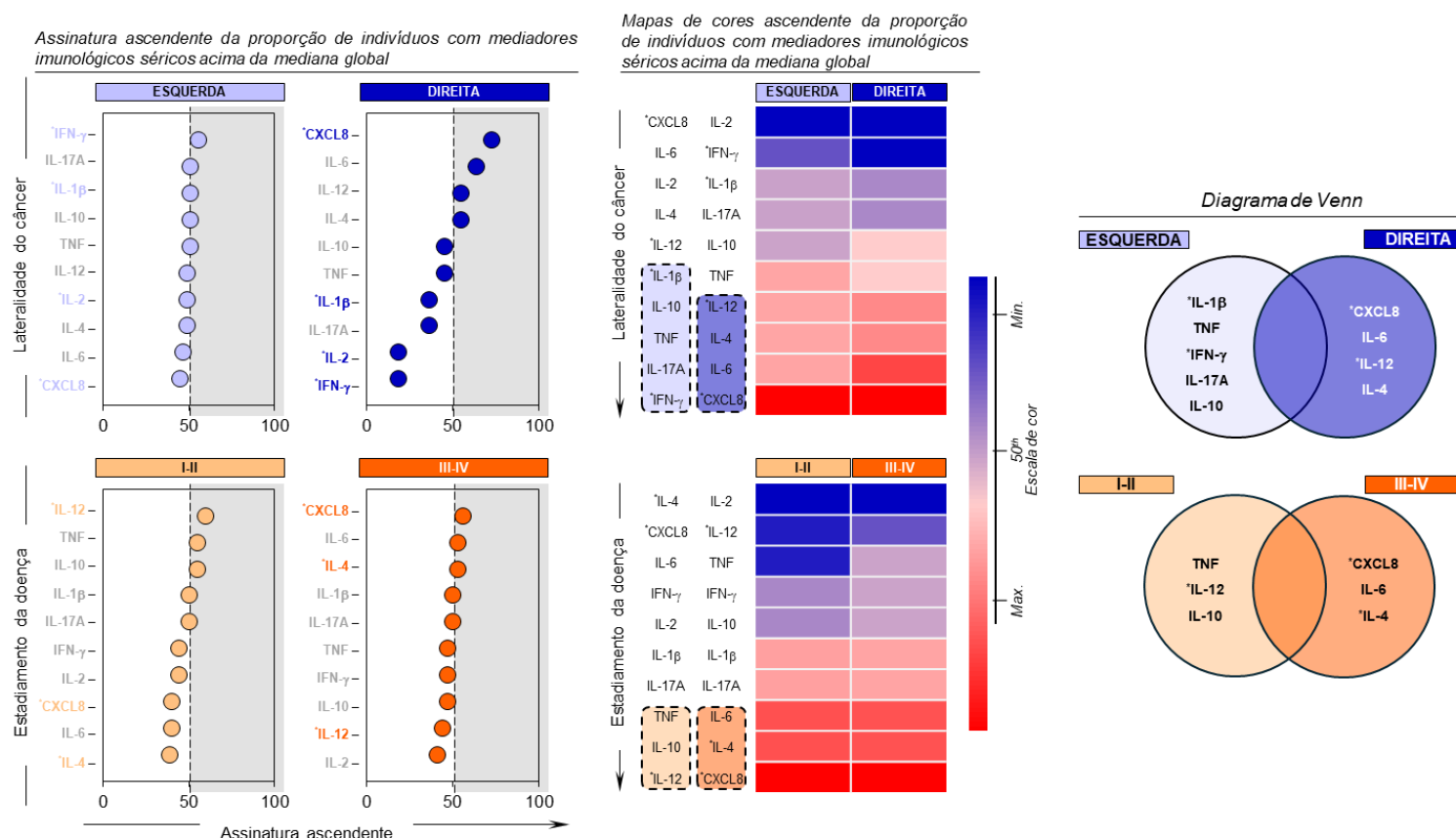


FIGURA 22: Assinaturas de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e o estadiamento da doença.

Legenda: As assinaturas foram construídas para mediadores imunológicos solúveis séricos, em pacientes com cancer colorretal. Os pacientes foram categorizados de acordo com a lateralidade da doença, esquerda (○) e direita (●), e de acordo com estadiamento I-II (○) e III-IV (●). Os dados contínuos foram convertidos em variáveis categóricas e os resultados apresentados como a proporção (%) de indivíduos com níveis de mediadores acima do ponto de corte da mediana global calculado para cada mediador. Utilizamos gráficos ascendentes para assinatura em cada grupo do estudo, para ilustrar os mediadores que apresentam proporção acima de 50%, utilizamos uma linha tracejada com fundo cinza no ponto 50%. Mapas de calor foram montados para ilustrar as mudanças nas assinaturas de mediadores entre os grupos, usando chaves de cores para exibir a proporção ascendente de 0 a 100 por cento (azul – proporção mínima, rosa – 50%, vermelho – proporção máxima), as mudanças no conjunto de biomarcadores com proporções acima do 50º percentil são destacadas pelo retângulo, com borda tracejada e com as respectivas cores dos grupos. Utilizamos Diagrama de Venn para ilustrar o que era seletivo em cada grupo, utilizamos aqueles mediadores que se apresentaram com a proporção acima da mediana global. O teste estatístico de Fisher foi realizado para comparar as proporções entre os grupos, aqueles com diferenças estatísticas significativas são apresentados nas cores dos seus respectivos grupos e com asterisco (*)

8.3.3 Matrizes e redes integrativas de correlação de mediadores imunológicos séricos em pacientes com CCR de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença.

As análises de correlação foram conduzidas utilizando o teste de correlação por postos de *Spearman*, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. Os coeficientes de correlação significativos (r) foram empregados para a construção das matrizes de correlação e subsequente elaboração das redes, realizadas no *Microsoft Excel* e na plataforma de software de código aberto *Cytoscape* (disponível em <https://cytoscape.org>), respectivamente.

A análise integrativa entre a lateralidade esquerda e direita foi realizada a partir de matrizes de correlação entre citocinas e posterior representação em grafos de rede. O objetivo foi identificar padrões de conectividade, interações compartilhadas e características seletivas de cada hemisfério, de modo a compreender o comportamento das vias imunorregulatórias de forma comparativa.

Na **Figura 23**, as matrizes de correlação para a **análise da lateralidade** (esquerda e direita) representam a intensidade e direção das associações entre as citocinas, sendo que os tons de azul indicam correlações positivas, enquanto os tons de vermelho denotam correlações negativas. Já as matrizes de correlação para a **análise por estadiamento** (I–II e III–IV), representam a intensidade e a direção das associações entre as citocinas, sendo que os tons de laranja representam correlações positivas, enquanto os tons de vermelho indicam correlações negativas, permitindo a visualização dos padrões de coexpressão entre os mediadores imunológicos.

Os grafos de rede que acompanham as matrizes apresentam as citocinas como “**nós**” interligados por arestas, representando as correlações significativas identificadas. As linhas vermelhas correspondem às conexões mais fortes e relevantes dentro da rede, destacando os principais eixos de comunicação e integração funcional entre as citocinas. As linhas tracejadas indicam conexões negativas, enquanto as linhas cinzas representam conexões seletivas do grupo analisado.

8.3.3.1 Análise das matrizes e redes integrativas de correlação de mediadores imunológicos séricos em pacientes com CCR de acordo com a lateralidade da doença.

A rede da lateralidade esquerda mostrou uma estrutura de conectividade moderadamente integrada, com interações predominantes envolvendo IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IL-10 e CXCL8. Essas citocinas compõem um núcleo funcional misto, unindo mediadores pró-

inflamatórios e anti-inflamatórios. A presença de IL-10 em múltiplas conexões reforça seu papel central como moduladora da inflamação, atuando na contenção dos efeitos pró-inflamatórios de IL-1 β e TNF. As citocinas IL-2 e IL-4 apresentaram correlações de menor intensidade. O grafo da rede esquerda indica uma densidade conectiva intermediária, com destaque para os pares IL-1 β –IL-6, TNF–IL-12 e CXCL8–IL-10, refletindo uma interação coordenada entre mediadores inflamatórios e quimiocinas.

A rede da lateralidade direita revelou maior densidade de conexões e diversificação nas interações, sugerindo maior complexidade funcional. Nesse grupo, observou-se um reforço das interações envolvendo IFN- γ , IL-17 e IL-12, associadas a perfis de resposta Th1 e Th17. A presença de IL-17 e IFN- γ como nós fortemente conectados indica um padrão imunológico mais ativado, possivelmente vinculado à amplificação da resposta inflamatória. Além disso, as citocinas CXCL8 e TNF mantêm-se como componentes centrais de comunicação, garantindo a integração entre vias pró-inflamatórias e regulatórias. Em comparação com a rede esquerda, a rede direita apresenta uma estrutura mais densa e heterogênea, o que pode indicar maior plasticidade da resposta imune, refletindo capacidade adaptativa diferenciada frente a estímulos específicos.

O Diagrama de Venn (Figura 23, à baixo) evidencia três conjuntos principais:

- **b3** – interações exclusivas da lateralidade esquerda;
- **a11** – interações compartilhadas por ambas as lateralidades;
- **c11** – interações exclusivas da lateralidade direita.

O predomínio da interseção (a11) demonstra uma alta sobreposição funcional, reforçando a simetria entre as lateralidades. Essa sobreposição inclui as principais citocinas IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10, IL-12, IFN- γ e CXCL8, que formam o núcleo comum das redes integrativas. Contudo, a lateralidade direita exibe um conjunto mais amplo de interações exclusivas (c11), principalmente envolvendo IL-17 e IFN- γ , destacando um perfil mais seletivo e possivelmente relacionado à resposta adaptativa e inflamatória tardia. Já a lateralidade esquerda apresentou menor número de interações exclusivas (b3), centradas em CXCL8 e IL-10, indicativas de uma resposta mais regulatória e moduladora.

8.3.3.2 Análise das matrizes e redes integrativas de correlação de mediadores imunológicos séricos em pacientes com CCR de acordo com o estadiamento da doença.

A rede do estadiamento I–II revelou uma estrutura de conectividade moderada, na qual se destacaram as interações entre IL-1 β , IL-6, TNF e IL-12, formando um núcleo central pró-inflamatório. A presença de IL-10 e CXCL8 interligadas a esses mediadores sugere uma regulação cruzada entre vias inflamatórias e anti-inflamatórias, configurando uma rede equilibrada e coordenada. Citocinas como IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-17 apresentaram menor número de conexões diretas, o que pode indicar funções mais específicas e moduladas dentro da rede.

A rede correspondente ao estadiamento III–IV apresentou maior densidade de conexões e diversificação nas interações, refletindo um padrão mais complexo e funcionalmente ativo. Foram observadas fortes interações entre IL-1 β , IL-6, TNF e IL-12, reforçando o papel dessas citocinas como núcleo de ativação inflamatória. Além disso, as citocinas IL-17 e IFN- γ surgem como conexões adicionais relevantes, indicando a ativação de vias adaptativas (Th1/Th17) que amplificam a resposta imune. A participação de IL-10 e CXCL8 no centro das interações reforça a importância dessas moléculas como elementos integradores, capazes de modular tanto a inflamação quanto a migração celular. Em comparação com o estadiamento I–II, o estadiamento III–IV exibe maior conectividade global e interações mais distribuídas, sugerindo maior especialização funcional e capacidade de resposta dinâmica frente a estímulos imunológicos complexos.

O Diagrama de Venn (Figura 24, à baixo) evidencia três subconjuntos principais:

- **b1** – interações exclusivas do estadiamento I–II;
- **a9** – interações comuns entre ambos os grupos de estadiamento;
- **c13** – interações exclusivas do estadiamento III–IV.

Observou-se que a região de sobreposição (a9) representa nove interações compartilhadas, refletindo um núcleo comum de integração imunológica, composto principalmente por IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10 e IL-12. Esses mediadores constituem o eixo central de comunicação entre as respostas pró e anti-inflamatórias. Contudo, o estadiamento III–IV (c13) apresentaram um número significativamente maior de interações exclusivas, caracterizadas pela presença de IFN- γ e IL-17, sugerindo maior especialização adaptativa e potencial ativação de vias efetoras. Já o estadiamento I–II (b1) apresentaram apenas uma interação exclusiva, reforçando seu caráter mais conservador e regulatório.

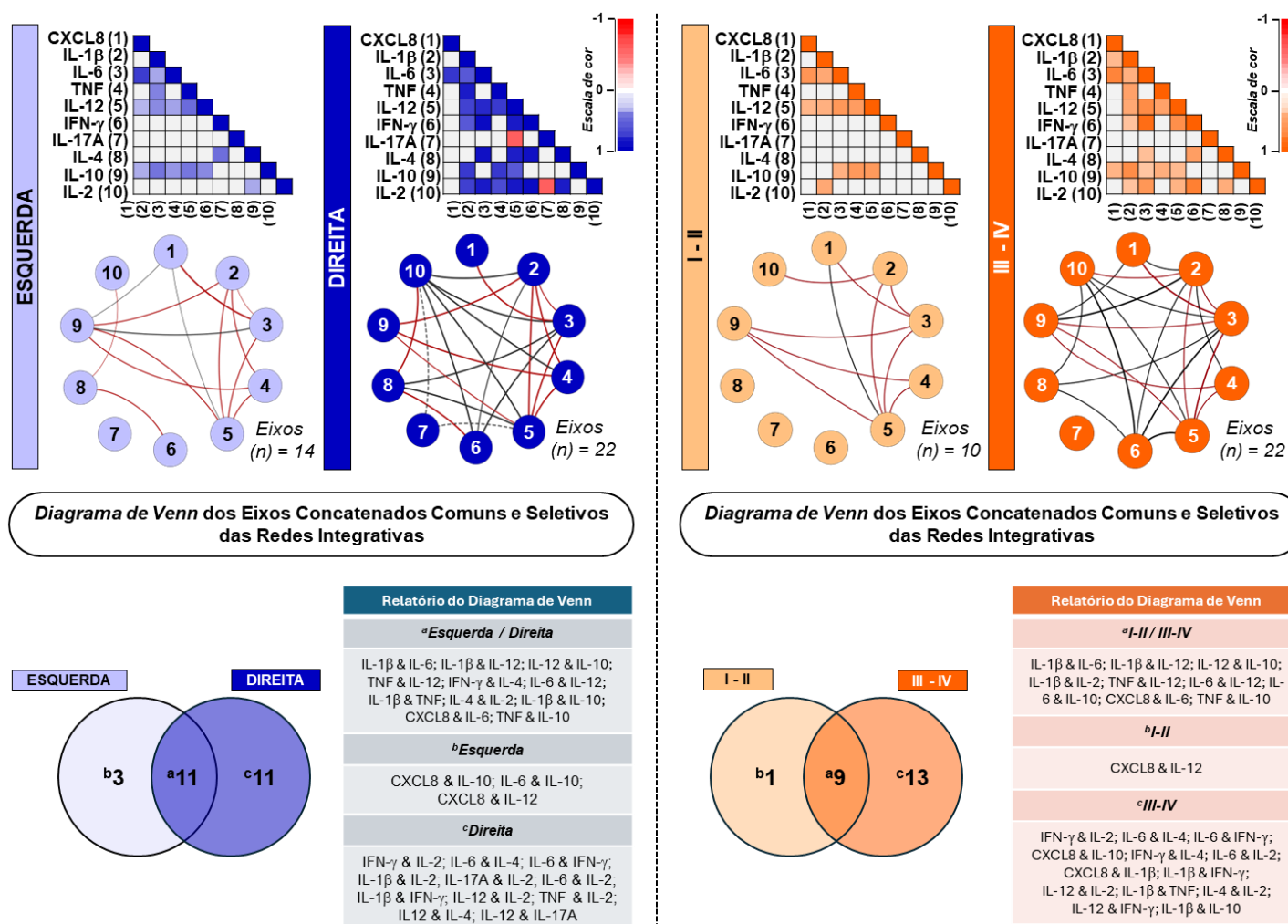


FIGURA 23: Matrices e redes integrativas de correlação de mediadores imunológicos séricos em pacientes com câncer colorretal de acordo com a lateralidade e estadiamento da doença.

Legenda: Matrices de correlação construídas a partir dos coeficientes (r) de *Spearman* entre mediadores séricos de pacientes com câncer colorretal. As correlações significativas ($p < 0,05$) são apresentadas em matrices triangulares, variando de -1 a +1, com gradiente de cores representando correlações negativas (vermelho) e positivas (azul) para os grupos de lateralidade, e negativas (vermelho) e positivas (laranja) para os grupos de estadiamento (I-II e III-IV). Células brancas indicam correlações não significativas. As redes de correlação, construídas em layout circular, apresentam nós correspondentes aos mediadores e arestas (linhas) indicando o tipo e a força da correlação: fraca ($<0,20$), moderada ($0,36-0,68$) ou forte ($>0,68$), conforme Taylor (1990). Correlações negativas são representadas por linhas tracejadas e as linhas em bordô (■) indicam correlações comuns entre os grupos. A análise de eixos concatenados evidencia as correlações seletivas e compartilhadas entre os grupos, representadas por diagramas de Venn.

9 CONCLUSÕES

Observou-se que variáveis clínicas, sociodemográficas e de estilo de vida influenciaram fortemente o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes com câncer colorretal incluídos no estudo. Destacam-se a distribuição etária, o sexo, a etnia, a procedência, fatores de risco como tabagismo e etilismo, a frequência do consumo de alimentos industrializados, de carne vermelha/processada e de carne salgada, bem como histórico familiar de câncer e presença de comorbidades. Do ponto de vista clínico-patológico, foram avaliadas lateralidade, localização primária do tumor segundo o CID, estadiamento da doença e condutas terapêuticas. Pode-se afirmar que idade, localização do tumor, presença de comorbidades e hábitos alimentares mostraram-se consistentes com dados previamente descritos na literatura, refletindo impactos relevantes sobre o estadiamento da doença e as estratégias de manejo clínico adotadas.

Quanto à microbiota intestinal, foi identificado um ecossistema diverso, porém funcionalmente heterogêneo, apresentando perfis microbianos distintos entre os pacientes. Dois padrões principais se destacaram: um caracterizado pelo enriquecimento de *Fusobacterium* e linhagens enterotoxigênicas de *Bacteroides fragilis*, sugerindo papel ativo na inflamação, modulação imune e progressão tumoral; e outro com predominância de *Bacteroides* e *Prevotella*, possivelmente relacionados aos hábitos alimentares regionais. Além disso, observou-se expansão de *Enterobacteriaceae* e baixa abundância de táxons benéficos como *Faecalibacterium* e *Roseburia*, indicando um quadro de disbiose e possível perda de funções protetoras. Esses achados revelam assinaturas microbianas regionais do câncer colorretal na população amazônica e apontam para potenciais biomarcadores diagnósticos e terapêuticos.

No que se refere aos perfis imunológicos, observou-se um desequilíbrio entre citocinas inflamatórias e reguladoras, com variações ligadas à lateralidade e ao estadiamento tumoral. Tumores localizados no lado direito apresentaram maior expressão de mediadores como CXCL8 e IL-6, enquanto o lado esquerdo mostrou maior proporção de citocinas efetoras, como IFN- γ e IL-1 β . Essas variações apontam para um microambiente tumoral diferencial, possivelmente relacionado à evasão imunológica em estágios mais avançados.

Considera-se, portanto, que os achados deste estudo reforçam a importância de abordagens integradas entre clínica, microbiota e imunologia para compreensão mais ampla da biologia tumoral. Os dados obtidos contribuem para o entendimento de potenciais marcadores inflamatórios e microbianos associados ao câncer colorretal e oferecem base para futuras investigações voltadas à personalização terapêutica e à formulação de estratégias regionais mais adequadas ao perfil da população estudada.

10 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As limitações deste estudo decorrem principalmente do uso de dados agregados provenientes de bancos preexistentes. Tais fontes, além de eventualmente apresentarem lacunas nas notificações pelo sistema de registro, carecem de informações detalhadas em nível individual, essenciais para análises mais precisas sobre a exposição a fatores de risco e os desfechos clínicos do câncer. Apesar dessas restrições, elas não foram suficientes para comprometer a validade dos resultados obtidos.

Além das limitações inerentes ao uso de dados agregados, o estudo enfrentou desafios práticos significativos na obtenção de informações e amostras biológicas. A disponibilidade de salas privativas ou consultórios adequados para abordagem dos pacientes, explicação detalhada do estudo e coleta de dados mostrou-se limitada. Essa restrição dificultou entrevistas e a obtenção de informações individuais essenciais para avaliar com precisão a exposição a fatores de risco e os desfechos clínicos do CCR.

Outro desafio importante foi a obtenção de amostras pareadas, particularmente de fezes. Muitos pacientes chegam à unidade terciária de saúde em estágio avançado da doença, frequentemente necessitando de intervenções cirúrgicas imediatas. Nessas condições, não há tempo hábil para a coleta prévia de material fecal antes de procedimentos cirúrgicos, quimioterápicos ou radioterápicos, limitando a disponibilidade de amostras comparáveis para análises da microbiota intestinal.

Essas limitações têm implicações diretas para o estudo da microbiota intestinal e dos perfis moleculares ligados ao CCR. A impossibilidade de coletar amostras antes de intervenções pode influenciar a composição microbiana observada, dificultando a interpretação de associações entre alterações da microbiota, estágio da doença e resposta terapêutica. Além disso, a ausência de dados detalhados individuais reduz a capacidade de correlacionar fatores epidemiológicos, hábitos alimentares e características clínicas com os achados microbiológicos, restringindo a profundidade das análises e a identificação de potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos.

11 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os objetivos específicos C e, embora não tenham sido contemplados na presente etapa da dissertação, serão abordados em análises subsequentes a fim de ampliar a compreensão sobre a interação entre microbiota intestinal, lateralidade tumoral e resposta imunológica em pacientes com câncer colorretal. Para o **Objetivo C**, está previsto realizar a caracterização do perfil microbiano estratificado pela lateralidade do tumor (cólon direito vs. esquerdo) e correlacioná-lo com os desfechos clínicos e prognósticos após 12 meses de acompanhamento, permitindo identificar potenciais assinaturas microbianas associadas à evolução da doença. Quanto ao **Objetivo E**, será conduzida a avaliação integrada dos mediadores imunológicos solúveis e da composição microbiana, com o intuito de investigar potenciais correlações entre a resposta inflamatória sistêmica e o microbioma intestinal. A realização dessas análises fornecerá informações valiosas para elucidar mecanismos fisiopatológicos, identificar possíveis biomarcadores prognósticos e contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas, resultando em publicações científicas de impacto.

12 ORÇAMENTO

ITEM	Quantidade	Unidade	Custo Unitário	Custo Total
Kit De Extração Magmax Micrbiom Ultra	100	Reações	R\$ 3.254,73	R\$ 3.254,73
PRIMERS	21	Uni	R\$ 101,00	R\$ 2.121,00
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	100	Reações	R\$ 2.060,80	R\$ 2.060,80
ChargeSwitch™ PCR Clean - Up Kit	1	Uni	R\$ 1.518,00	R\$ 1.518,00
DynaMag™-2 Magnet	1	Uni	R\$ 4.121,28	R\$ 4.121,28
Qubit™ dsDNA - Quantification Assay Kits	100	Reações	R\$ 730,80	R\$ 730,80
Qubit™ TUBOS DE REACAO	500	Uni	R\$ 643,80	R\$ 643,80
Ion 510™ Chip Kit	8	Uni	R\$ 20.217,93	R\$ 20.217,93
Kit Chef (ION 510, 520, 530) 2 Sequenciamentos por inicialização	8	Reações	R\$ 47.873,55	R\$ 47.873,55
Água Livre de Nuclease (1L)	1	Uni	R\$ 572,24	R\$ 572,24
Etanol Absoluto 99,8% PA ACS (1L)	1	Uni	R\$ 325,35	R\$ 325,35
Material de plástico para coleta de amostra, de expediente (papel, tinta para impressora, etc.) e EPI's	1	Uni	R\$ 2.000,00	R\$ 2.000,00
Passagens aéreas para congressos	2	Uni	R\$ 1.900,00	R\$ 3.800,00
			TOTAL	R\$ 89.239,48

13 FONTE DE FINANCIAMENTO

Agradecemos o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo projeto intitulado ***“Identificação de mutações em genes supressores e de suscetibilidade envolvidos na resistência ao tratamento de pacientes com Câncer de Colorretal do Estado do Amazonas”***, coordenado pela Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins e aprovado pelo Edital no 002/2021 do “Programa Amazônidas – Mulheres e Meninas na Ciência”. Os recursos para a caracterização genética de oncogenes e genes supressores relacionados ao câncer colorretal foram oriundos desse projeto, que também contou com o apoio financeiro da “Rede Genômica de Vigilância em Saúde: Otimização da Assistência e Pesquisa no Estado do Amazonas – REGESAM”, no âmbito do Programa/FAPEAM – Programa Pró Estado, Resolução N. 002/2008-FAPEAM.

14 CRONOGRAMA

ATIVIDADES	2023											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Elaboração do projeto								R	R	R	R	R
Pesquisa bibliográfica e documental								R	R	R	R	R
Coleta de Dados								R	R	R	R	R
Coleta de Amostras								R	R	R	R	R

ATIVIDADES	2024											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Coleta de Dados	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Coleta de Amostras	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tabulação de dados obtidos	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Estruturação da dissertação para a qualificação					R	R	R	R	R			
Quantificação das citocinas						R	R				R	R
Qualificação da dissertação de Mestrado										R		

ATIVIDADES	2025											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Sequenciamento das amostras de fezes						R						
Tabulação de dados obtidos					R	R	R	R				
Elaboração de dissertação - Final					R	R	R	R				
Revisão e correção da dissertação						R	R	R				
Publicação em periódicos										X	X	X
Defesa final da dissertação									R			

15 EQUIPE ENVOLVIDA

Nome	Instituição	Titulação	Especialidade	Responsabilidades
Jhonnatan Silva de Souza	FCECON UFAM	Mestrando em Imunologia Básica e Aplicada	Biomédico	Mestrando. Presente em todas as etapas do projeto.
Valquíria do Carmo Alves Martins	FCECON UFAM	Doutora em Imunologia Básica e Aplicada	Farmacêutica Bioquímica	Orientadora.
Kátia Luza Torres Silva	FCECON UFAM	Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias	Farmacêutica Bioquímica	Coorientadora.
Allyson Guimarães da Costa	FUNDAÇÃO HEMOAM UFAM	Doutor em Medicina Tropical	Enfermeiro	Colaborador, presente nas análises de citocinas.
Adriana Malheiro Alle Marie	FUNDAÇÃO HEMOAM UFAM	Doutora em Imunologia Básica e Aplicada - UFAM	Bi	Colaboradora, presente nas análises de citocinas.
Ábner Souza Paz	FCECON	Doutor em Imunologia Básica e Aplicada - UFAM	Nutricionista	Colaborador, presente no recrutamento dos pacientes.
Nayara Souza Castro	FCECON A.C.CAMARGO CANCER CENTER	Doutoranda do DINTER - Fundação CECON / A.C.Camargo Cancer Center	Bióloga; Nutricionista;	Colaboradora, presente no recrutamento e nas análises laboratoriais.
Thiago Silveira Paiva	FCECON A.C.CAMARGO CANCER CENTER	Doutorando do DINTER - A C Camargo Cancer Center	Médico	Colaborador, presente no recrutamento dos pacientes.
Geyse Adriana da Silva Soares	FUNDAÇÃO HEMOAM UFAM	Doutoranda em Imunologia Básica e Aplicada	Biomédica	Colaboradora, presente nas análises de citocinas.
Wivian da Conceição Costa da Silva	FUNDAÇÃO HEMOAM UFAM	Doutoranda em Imunologia Básica e Aplicada	Biomédica	Colaboradora, presente nas análises de citocinas.
Flávia Níniver de Oliveira Gomes	FCECON UFAM	Mestranda em Imunologia Básica e Aplicada	Farmacêutica	Colaboradora, presente no recrutamento e nas análises laboratoriais.
Mikele Praia de Oliveira	FCECON UFAM	Mestranda em Imunologia Básica e Aplicada	Biomédica	Colaboradora, presente no recrutamento e nas análises laboratoriais
Claúdio Lucas dos Santos Catão	FUNDAÇÃO HEMOAM UFAM	Doutorando em Imunologia Básica e Aplicada	Biomédico	Colaborador, presente nas análises de citocinas.
Maiko Ramos Maia	FCECON UFAM	Especialização em Patologia	Médico	Colaborador, presente nas análises anatomopatológicas

16 REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7ª Edição**. 7ª Edição ed. [S.l.]: Elsevier Brasil, 2012.
- ABED, Jawad *et al.* Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 2, p. 215–225, 10 ago. 2016.
- ALJAMA, Sara *et al.* Dichotomous colorectal cancer behaviour. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 189, p. 104067, 1 set. 2023.
- ALLEN-VERCOE, Emma; COBURN, Bryan. A Microbiota-Derived Metabolite Augments Cancer Immunotherapy Responses in Mice. **Cancer Cell**, v. 38, n. 4, p. 452–453, 12 out. 2020.
- ALLOCATI, Nerino *et al.* *Escherichia coli* in Europe: an overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235–6254, 25 nov. 2013.
- ALNEBERG, Johannes *et al.* Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**, v. 11, n. 11, p. 1144–1146, nov. 2014.
- ALRAFAS, Haider Rasheed *et al.* Alterations in the Gut Microbiome and Suppression of Histone Deacetylases by Resveratrol Are Associated with Attenuation of Colonic Inflammation and Protection Against Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1796, jun. 2020.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer Statistics | How Common Is Colorectal Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 3 jan. 2024.
- AMIN, Mahul B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93–99, 2017.
- ANDREWS, Simon. **Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 15 set. 2025.
- ARAUJO, Camila S. *et al.* Real-world Data for High-risk Stage II Colorectal Cancer - The Role of Tumor Side in the Adjuvant Setting. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 20, n. 2, p. e100–e108, jun. 2021.
- ARGILÉS, Josep M.; BUSQUETS, Sílvia; LÓPEZ-SORIANO, Francisco J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 4, p. 401–406, jul. 2003.
- ARNOLD, D. *et al.* Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials†. **Annals of Oncology**, Changes in serum IL-8 levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and NSCLC. v. 28, n. 8, p. 1713–1729, 1 ago. 2017.
- ARUMUGAM, Manimozhiyan *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, maio 2011.
- BALDELLI, Valerio *et al.* The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 697, abr. 2021.

- BARAN, Burcin *et al.* Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. **Gastroenterology Research**, v. 11, n. 4, p. 264–273, ago. 2018.
- BAROT, Shimoli V. *et al.* Distinct intratumoral microbiome of young-onset and average-onset colorectal cancer. **eBioMedicine**, v. 100, p. 104980, 1 fev. 2024.
- BAZZICHETTO, Chiara *et al.* Interleukin-8 in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Its Potential Role as a Prognostic Biomarker. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2631, 19 out. 2022.
- BERBERT, L. *et al.* Metagenomics analysis reveals universal signatures of the intestinal microbiota in colorectal cancer, regardless of regional differences. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, p. e11832, 2022.
- BIKEL, Shirley *et al.* Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 390–401, 1 jan. 2015.
- BOLEIJ, Annemarie *et al.* The Bacteroides fragilis Toxin Gene Is Prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 2, p. 208–215, 15 jan. 2015.
- BONNET, Mathilde *et al.* Colonization of the Human Gut by E. coli and Colorectal Cancer Risk. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 859–867, 16 fev. 2014.
- BOROWCZAK, Jędrzej *et al.* The Role of Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Colorectal Carcinoma—Recent Findings and Review. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1670, 11 jul. 2022.
- BOUTER, Kristien E. *et al.* Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1671–1678, maio 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **TabNet Win32 3.2: Mortalidade - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 9 jan. 2024.
- BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BRENNAN, Caitlin A.; GARRETT, Wendy S. Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 156–166, mar. 2019.
- BRUKHOVETSKA, Daria *et al.* Interleukins in cancer: from biology to therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 8, p. 481–499, ago. 2021.
- BRULÉ, S. Y. *et al.* Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 11, p. 1405–1414, 1 jul. 2015.
- BUC, Emmanuel *et al.* High Prevalence of Mucosa-Associated E. coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56964, 14 fev. 2013.
- BUNDGAARD-NIELSEN, Caspar *et al.* The presence of bacteria varies between colorectal adenocarcinomas, precursor lesions and non-malignant tissue. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 399, 29 abr. 2019.

- BURCELIN, Rémy *et al.* Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 15 Suppl 3, p. 61–70, set. 2013.
- BUSTAMANTE-LOPEZ, Leonardo Alfonso *et al.* IS THERE A DIFFERENCE BETWEEN RIGHT- VERSUS LEFT-SIDED COLON CANCERS? DOES SIDE MAKE ANY DIFFERENCE IN LONG-TERM FOLLOW-UP? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 32, p. e1479, 20 dez. 2019.
- CALLAHAN, Benjamin. Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 132). 13 fev. 2018.
- CALLAHAN, Benjamin J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.
- CAO, Yaqi *et al.* Intratumoural microbiota: a new frontier in cancer development and therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 15, 10 jan. 2024.
- CARTER, A. *et al.* The role of interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in human multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, v. 74, n. 4, p. 424–431, abr. 1990.
- CASCELLA, Marco *et al.* Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. **Infectious Agents and Cancer**, v. 13, n. 1, p. 3, 15 jan. 2018.
- CASSOL, Ignacio; IBAÑEZ, Mauro; BUSTAMANTE, Juan Pablo. Key features and guidelines for the application of microbial alpha diversity metrics. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 622, 3 jan. 2025.
- CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 48, n. 10, p. 445–453, 1994.
- CENTUORI, Sara M.; MARTINEZ, Jesse D. Differential Regulation of EGFR–MAPK Signaling by Deoxycholic Acid (DCA) and Ursodeoxycholic Acid (UDCA) in Colon Cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 10, p. 2367–2380, 1 out. 2014.
- CHEN, Beibei *et al.* Circulating DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 15, p. 13577, 19 abr. 2025.
- CHEN, Bing *et al.* Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. **Open Biology**, v. 9, n. 1, p. 180212, 31 jan. 2019.
- CHEN, Yongyan *et al.* Interaction Between Commensal Bacteria, Immune Response and the Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 761981, 11 nov. 2021.
- CHENG, Yiwen; LING, Zongxin; LI, Lanjuan. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- CLINTON, Steven K.; GIOVANNUCCI, Edward L.; HURSTING, Stephen D. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 4, p. 663, abr. 2020.
- ColOff**. , 12 dez. 2019. Disponível em: <https://files.zymoresearch.com/protocols/r1101-2-5-coloff_consumer_medical_information_cmi.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2024

COLUSSI, Dora *et al.* Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16365–16385, 7 ago. 2013.

CORRIE, L. *et al.* Polysaccharide, fecal microbiota, and curcumin-based novel oral colon-targeted solid self-nanoemulsifying delivery system: formulation, characterization, and in-vitro anticancer evaluation. **Materials Today Chemistry**, v. 26, p. 101165, 1 dez. 2022.

COWLING, Thomas E. *et al.* One-year mortality of colorectal cancer patients: development and validation of a prediction model using linked national electronic data. **British Journal of Cancer**, v. 123, n. 10, p. 1474–1480, 10 nov. 2020.

CUELLAR-GÓMEZ, H. *et al.* Association of *Fusobacterium nucleatum* infection and colorectal cancer: A Mexican study. **Revista de Gastroenterología de México (English Edition)**, v. 87, n. 3, p. 277–284, 1 jul. 2022.

CZAJKA-FRANCUZ, Paulina *et al.* Systemic Interleukins' Profile in Early and Advanced Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 124, 23 dez. 2021.

CZAJKA-FRANCUZ, Paulina *et al.* Systemic Interleukins' Profile in Early and Advanced Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 124, jan. 2022.

DA COSTA, Carolina Pinto *et al.* The Tissue-Associated Microbiota in Colorectal Cancer: A Systematic Review. **Cancers**, v. 14, n. 14, p. 3385, 12 jul. 2022.

DADGAR-ZANKBAR, Leila *et al.* Exploring the role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: implications for tumor proliferation and chemoresistance. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 547, 15 nov. 2024.

DE CARVALHO, Ana Carolina *et al.* Microbiota Profile and Impact of *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Cancer Patients of Barretos Cancer Hospital. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 813, 2019.

DE PALMA, Fatima Domenica Elisa *et al.* The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 1017, jul. 2019.

DE SOUZA, Jaqueline Barbosa; BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly; CAVALCANTI, Isabella Macário Ferro. Strategies for the treatment of colorectal cancer caused by gut microbiota. **Life Sciences**, v. 290, p. 120202, 1 fev. 2022.

DEKKER, Evelien *et al.* Colorectal cancer. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 19 out. 2019.

DIENSTMANN, Rodrigo *et al.* Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 79–92, fev. 2017.

DJ, Morrison; T, Preston. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut microbes**, v. 7, n. 3, 5 mar. 2016.

DMITRIEVA-POSOTTO, Oxana *et al.* Cell-Type-Specific Responses to Interleukin-1 Control Microbial Invasion and Tumor-Elicited Inflammation in Colorectal Cancer. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 166–180.e7, 15 jan. 2019.

- DONALDSON, Gregory P.; LEE, S. Melanie; MAZMANIAN, Sarkis K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, jan. 2016.
- DOS SANTOS, Wellington *et al.* Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13687, 23 set. 2019.
- DOUAIHER, Jeffrey *et al.* Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. **Journal of Surgical Oncology**, v. 115, n. 5, p. 619–630, abr. 2017.
- DOUGHERTY, Michael W.; JOBIN, Christian. Shining a Light on Colibactin Biology. **Toxins**, v. 13, n. 5, p. 346, 12 maio 2021.
- ESCOBAR-ZEPEDA, Alejandra; VERA-PONCE DE LEÓN, Arturo; SANCHEZ-FLORES, Alejandro. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 348, 2015.
- FEARON, Eric R.; VOGELSTEIN, Bert. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759–767, jun. 1990.
- FENG, Qiang *et al.* Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6528, 11 mar. 2015.
- FERLAY, Jacques *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, 5 abr. 2021.
- FERNANDES, Mydian Gabriela dos Santos *et al.* Microbioma intestinal versus Câncer Colorretal. **CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES**, v. 17, n. 1, p. 3406–3417, 17 jan. 2024.
- FERREIRA, Caroline Marcantonio *et al.* The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 689492, 2014.
- FISHER, R. A.; CORBET, A. Steven; WILLIAMS, C. B. The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population. **Journal of Animal Ecology**, v. 12, n. 1, p. 42–58, 1943.
- FOPPA, Caterina *et al.* Rectal Cancer in Adolescent and Young Adult Patients: Pattern of Clinical Presentation and Case-Matched Comparison of Outcomes. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 64, n. 9, p. 1064, set. 2021.
- FOUAD, Mariam A. *et al.* Fluoropyrimidine therapy induced alterations in interleukins expression in colorectal cancer patients. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 35, p. 20587384211008332, 1 jan. 2021.
- FOURIE, Nicolaas H. *et al.* Structural and functional alterations in the colonic microbiome of the rat in a model of stress induced irritable bowel syndrome. **Gut Microbes**, v. 8, n. 1, p. 33–45, 2 jan. 2017.
- FRAGIADAKIS, Gabriela K. *et al.* Long-term dietary intervention reveals resilience of the gut microbiota despite changes in diet and weight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 111, n. 6, p. 1127–1136, 1 jun. 2020.
- FUNG, Thomas C.; OLSON, Christine A.; HSIAO, Elaine Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145–155, fev. 2017.

FUSCO, William *et al.* Gut microbiota in colorectal cancer: From pathogenesis to clinic. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Microbiome, inflammation and Cancer. v. 72, p. 101941, 1 set. 2024.

GARCÍA MENÉNDEZ, Gissel *et al.* From colon wall to tumor niche: Unraveling the microbiome's role in colorectal cancer progression. **PLOS ONE**, v. 19, n. 10, p. e0311233, 22 out. 2024.

GEIS, Abby L. *et al.* Regulatory T-cell Response to Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Colonization Triggers IL17-Dependent Colon Carcinogenesis. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 10, p. 1098–1109, 30 set. 2015.

GENEVE, Nikerson *et al.* Colorectal Cancer Screening. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, Prevention and Screening. v. 46, n. 1, p. 135–148, 1 mar. 2019.

GIJSBERS, Klara *et al.* CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 7, p. 1992–2000, jul. 2004.

GILLESPIE, S. H. 7 - Gram-negative bacilli. *In*: GILLESPIE, S. H. (Org.). **Medical Microbiology Illustrated**. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, 1994. p. 82–91.

GONÇALVES, Catarina *et al.* Differences Between Right and Left Colon Cancer in Beira Interior. **Cureus**, v. 15, n. 4, 12 abr. 2023.

GRADY, William M.; CARETHERS, John M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1079–1099, out. 2008.

GRELLIER, Nathan *et al.* Gut microbiota in inflammation and colorectal cancer: A potential Toolbox for Clinicians. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Microbiome, inflammation and Cancer. v. 72, p. 101942, 1 set. 2024.

GULEN, Sule T. *et al.* Adipokines and systemic inflammation in weight-losing lung cancer patients. **Lung**, v. 190, n. 3, p. 327–332, jun. 2012.

GUO, Libin *et al.* Regulation of IFN- γ -mediated PD-L1 expression by MYC in colorectal cancer with wild-type KRAS and TP53 and its clinical implications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1022129, 13 dez. 2022.

GUPTA, Samir *et al.* Birth Cohort Colorectal Cancer (CRC): Implications for Research and Practice. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 3, p. 455- 469.e7, 1 mar. 2024.

HALFVARSON, Jonas *et al.* Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17004, 13 fev. 2017.

HEIN, David M. *et al.* Assessment of Distinct Gut Microbiome Signatures in a Diverse Cohort of Patients Undergoing Definitive Treatment for Rectal Cancer. **Journal of Immunotherapy and Precision Oncology**, v. 7, n. 3, p. 150–158, 19 ago. 2024.

HEXUN, Zhang *et al.* High abundance of Lachnospiraceae in the human gut microbiome is related to high immunoscores in advanced colorectal cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy : CII**, v. 72, n. 2, p. 315–326, 22 jul. 2022.

- HOFSETH, Lorne J. *et al.* Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 6, p. 352–364, jun. 2020.
- HOLCH, Julian Walter *et al.* The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. **European Journal of Cancer**, v. 70, p. 87–98, 1 jan. 2017.
- HOU, Kaijian *et al.* Microbiota in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–28, 23 abr. 2022.
- HOUSSEAU, Franck *et al.* Redundant Innate and Adaptive Sources of IL17 Production Drive Colon Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 76, n. 8, p. 2115–2124, 14 abr. 2016.
- HU, Wangxiong *et al.* Multi-omics Approach Reveals Distinct Differences in Left- and Right-Sided Colon Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. 476–485, 1 mar. 2018.
- HUANG, Xue *et al.* Associations of tumor necrosis factor- α polymorphisms with the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, 1 jan. 2019.
- HUGEN, N. *et al.* Prognosis and value of adjuvant chemotherapy in stage III mucinous colorectal carcinoma. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 24, n. 11, p. 2819–2824, nov. 2013.
- HUGEN, Niek *et al.* Insight into Mucinous Colorectal Carcinoma: Clues from Etiology. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n. 9, p. 2963–2970, 1 set. 2014.
- HUO, Rui-Xue *et al.* Gut mucosal microbiota profiles linked to colorectal cancer recurrence. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 18, p. 1946–1964, 14 maio 2022.
- IBRAHIM, Ashraf E. K. *et al.* Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression. **Gut**, v. 60, n. 4, p. 499–508, abr. 2011.
- INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa - 2023**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/apresentacao>>. Acesso em: 28 jan. 2023.
- INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml?jsessionid=E942F628BCED62569346D69A3459DB70#panelResultado>>. Acesso em: 9 jan. 2024.
- IONESCU, Vlad Alexandru *et al.* Gut Microbiota and Colorectal Cancer: A Balance Between Risk and Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 8, p. 3733, 15 abr. 2025.
- ISLAM, Maafi R. *et al.* The Role of Gut Microbiota and Metabolites in Obesity-Associated Chronic Gastrointestinal Disorders. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 624, jan. 2022.
- IZUMI, Daisuke *et al.* Molecular insights into colorectal cancer stem cell regulation by environmental factors. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 1, p. 156–162, 15 out. 2015.
- JAIN, Aakanksha *et al.* T cells instruct myeloid cells to produce inflammasome-independent IL-1 β and cause autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 21, n. 1, p. 65–74, jan. 2020.

JALANKA, Jonna *et al.* Colonic Mucosal Microbiota and Association of Bacterial Taxa with the Expression of Host Antimicrobial Peptides in Pediatric Ulcerative Colitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6044, 22 ago. 2020.

JEYAKUMAR, Thiviya *et al.* Inactivation of Interferon Regulatory Factor 1 Causes Susceptibility to Colitis-Associated Colorectal Cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18897, 11 dez. 2019.

JUNIOR, José Lucas Pereira. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA COMO MARCADOR DE ATIVIDADE TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais - Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 4, 2009.

KALANTZIS, Ioannis *et al.* Clinicopathological differences and correlations between right and left colon cancer. **World Journal of Clinical Cases**, v. 8, n. 8, p. 1424–1443, 26 abr. 2020.

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**, v. 28, n. 44, p. 3892–3902, nov. 2009.

KARLSSON, Fredrik *et al.* Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3341–3349, out. 2013.

KENNEDY, Paul J. *et al.* Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder? **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 39, p. 14105–14125, 21 out. 2014.

KEUM, NaNa; GIOVANNUCCI, Edward. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713–732, dez. 2019.

KIM, Bo-Ra *et al.* Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 28 dez. 2017.

KITTANA, Hatem *et al.* Commensal *Escherichia coli* Strains Can Promote Intestinal Inflammation via Differential Interleukin-6 Production. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2318, 2018.

KLOSE, Johannes *et al.* Does Side Really Matter? Survival Analysis among Patients with Right- Versus Left-Sided Colon Cancer: A Propensity Score-Adjusted Analysis. **Annals of Surgical Oncology**, v. 28, n. 5, p. 2768–2778, maio 2021.

KOBAYASHI, Taku *et al.* Ulcerative colitis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 10 set. 2020.

KOSMIDIS, Christoforos *et al.* Interferon- γ and Colorectal Cancer: an up-to date. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 2, p. 232–238, 1 jan. 2018.

KOSTIC, Aleksandar D. *et al.* Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. **Genome Research**, v. 22, n. 2, p. 292–298, fev. 2012.

KOSTIC, Aleksandar D. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 2, p. 207–215, 14 ago. 2013.

- KUIPERS, Ernst J. *et al.* Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15065, 5 nov. 2015.
- KUMAR, Ranjit *et al.* Getting started with microbiome analysis: sample acquisition to bioinformatics. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 82, p. 18.8.1-18.8.29, 14 jul. 2014.
- KUNIN, Victor *et al.* A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 72, n. 4, p. 557–578, Table of Contents, dez. 2008.
- KUNZMANN, Andrew T. *et al.* Fusobacterium nucleatum tumor DNA levels are associated with survival in colorectal cancer patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 1891–1899, out. 2019.
- LAFAY, Lionel; ANCELLIN, Raphaëlle. Alimentation et cancer colorectal. **Cahiers de Nutrition et de Diététique**, v. 50, n. 5, p. 262–270, 1 nov. 2015.
- LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 9 fev. 2017.
- LANSOM, Joshua *et al.* Right vs. Left colorectal cancer – Where do we draw the line? **Human Pathology**, v. 151, p. 105634, 1 set. 2024.
- LAWRENCE, Garreth W. *et al.* Potential Use of Biotherapeutic Bacteria to Target Colorectal Cancer-Associated Taxa. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 924, jan. 2020.
- LEE, Ja-Young *et al.* Contribution of the 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from Ruminococcus gnavus N53 to ursodeoxycholic acid formation in the human colon [S]. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 11, p. 3062–3069, 1 nov. 2013.
- LEPAGE, Patricia *et al.* Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 227–236, jul. 2011.
- LI, Jingjing *et al.* The Role of Interleukins in Colorectal Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 13, p. 2323–2339, 14 jun. 2020.
- LI, Junshu *et al.* Colitis-associated carcinogenesis: crosstalk between tumors, immune cells and gut microbiota. **Cell & Bioscience**, v. 13, n. 1, p. 194, 24 out. 2023.
- LI, Kelvin *et al.* Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e32118, 13 jun. 2012.
- LI, Qingran *et al.* Butyrate Suppresses the Proliferation of Colorectal Cancer Cells via Targeting Pyruvate Kinase M2 and Metabolic Reprogramming. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 17, n. 8, p. 1531–1545, ago. 2018.
- LI, Xia *et al.* MLH1 Promoter Methylation Frequency in Colorectal Cancer Patients and Related Clinicopathological and Molecular Features. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59064, 29 mar. 2013.
- LIANG, Lei *et al.* Distinct microbes, metabolites, and the host genome define the multi-omics profiles in right-sided and left-sided colon cancer. **Microbiome**, v. 12, p. 274, 28 dez. 2024.
- LIANG, Weiren *et al.* Gut microbiota shifts in patients with gastric cancer in perioperative period. **Medicine**, v. 98, n. 35, p. e16626, 30 ago. 2019.

LICHTENSTERN, Charles Robert; LAMICHHANE-KHADKA, Reena. A tale of two bacteria – *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, and colorectal cancer. **Frontiers in Bacteriology**, v. 2, 26 jul. 2023.

LIU, Yujing *et al.* Secondary Bile Acids and Tumorigenesis in Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 28 abr. 2022.

LUO, Cong *et al.* Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. **Cancer Communications**, v. 39, p. 13, 29 mar. 2019.

LUPINACCI, Renato Micelli *et al.* Prognostic implication of mucinous histology in resected colorectal cancer liver metastases. **Surgery**, v. 155, n. 6, p. 1062–1068, jun. 2014.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1035S-1045S, maio 1999.

MANGAN, Paul R. *et al.* Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, maio 2006.

MANGONE, Lucia *et al.* Colon cancer survival differs from right side to left side and lymph node harvest number matter. **BMC Public Health**, v. 21, n. 1, p. 906, 12 maio 2021.

MARCHESI, Julian R. *et al.* Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. **PLOS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20447, 24 maio 2011.

MCNABB, Sarah *et al.* Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 3, p. 861–873, 2020.

MICHAUDEL, Chloé; SOKOL, Harry. The Gut Microbiota at the Service of Immunometabolism. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 514–523, 6 out. 2020.

MILONE, Marco *et al.* Surgical stress and metabolic response after totally laparoscopic right colectomy. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9652, 6 maio 2021.

MIRSEPASI-LAURIDSEN, Hengameh Chloé *et al.* *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. e00060-18, 20 mar. 2019.

MISSIAGLIA, E. *et al.* Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 10, p. 1995–2001, 1 out. 2014.

MONTASSIER, Emmanuel *et al.* 16S rRNA gene pyrosequencing reveals shift in patient faecal microbiota during high-dose chemotherapy as conditioning regimen for bone marrow transplantation. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 3, p. 690–699, abr. 2014.

MÜLLER, Mike F.; IBRAHIM, Ashraf E. K.; ARENDS, Mark J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 469, n. 2, p. 125–134, ago. 2016.

MURPHY, Neil *et al.* Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 69, p. 2–9, out. 2019.

NAGASAKI, T. *et al.* Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 2, p. 469–478, jan. 2014.

NAGTEGAAL, Iris D. *et al.* Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging—A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 10, p. 1119–1127, abr. 2017.

NAGTEGAAL, Iris D. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. **Histopathology**, v. 76, n. 2, p. 182–188, 2020.

NAKATSU, Geicho *et al.* Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8727, 30 out. 2015.

NAKAZAKI, H. Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer. **Cancer**, v. 70, n. 3, p. 709–713, 1 ago. 1992.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 2, p. 319–326, fev. 1987.

NETTO, Maiara Zanette; MARQUES, Schérolin de Oliveira. A influência da alimentação na prevenção do câncer colorretal: uma revisão bibliográfica. **Inova Saúde**, v. 14, n. 4, p. 187–198, 19 fev. 2024.

NGUYEN, Stephen P. *et al.* Gender as a Risk Factor for Advanced Neoplasia and Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 6, p. 676–681.e3, jun. 2009.

NISHINO, Kyohei *et al.* Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 1, p. 95–106, 1 jan. 2018.

NIU, Huifang *et al.* Akkermansia muciniphila: a potential candidate for ameliorating metabolic diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 20 mar. 2024.

NOCE, Annalisa *et al.* Impact of Gut Microbiota Composition on Onset and Progression of Chronic Non-Communicable Diseases. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1073, 14 maio 2019.

NOURI, Roghayeh *et al.* Escherichia coli and Colorectal Cancer: Unfolding the Enigmatic Relationship. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1257–1268, 7 jan. 2022.

ORANGE, Samuel T. *et al.* The exercise IL-6 enigma in cancer. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 34, n. 11, p. 749–763, 1 nov. 2023.

O'RIORDAIN, M. G. *et al.* Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism. **International Journal of Oncology**, v. 15, n. 4, p. 823–827, out. 1999.

O'SULLIVAN, Brian *et al.* The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. **The Lancet. Oncology**, v. 18, n. 7, p. 849–851, jul. 2017.

OU, Suwen *et al.* Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: From phenomenon to mechanism. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1020583, 29 nov. 2022.

- PALM, Noah W.; DE ZOETE, Marcel R.; FLAVELL, Richard A. Immune-microbiota interactions in health and disease. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 159, n. 2, p. 122–127, ago. 2015.
- PANDEY, Himani *et al.* Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Biological Role and Therapeutic Opportunities. **Cancers**, v. 15, n. 3, p. 866, 30 jan. 2023.
- PASCALE, Alessia *et al.* Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, v. 61, n. 3, p. 357–371, set. 2018.
- PELLINO, Gianluca *et al.* Comparison of Western and Asian Guidelines Concerning the Management of Colon Cancer. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 61, n. 2, p. 250–259, fev. 2018.
- PETRELLI, Fausto *et al.* Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 2, p. 211–219, 1 fev. 2017.
- PILARCZYK-ZUREK, Magdalena *et al.* The dual role of Escherichia coli in the course of ulcerative colitis. **BMC gastroenterology**, v. 16, n. 1, p. 128, 10 out. 2016.
- PINTO, Susanne *et al.* Dynamics of Gut Microbiota After Fecal Microbiota Transplantation in Ulcerative Colitis: Success Linked to Control of Prevotellaceae. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 19, n. 2, p. jjae137, 1 fev. 2025.
- PLEGUEZUELOS-MANZANO, Cayetano *et al.* Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ E. coli. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269–273, abr. 2020.
- PONVILAWAN, Ben *et al.* Comprehensive genomic analysis in sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma patients. **BMC Cancer**, v. 25, p. 349, 25 fev. 2025.
- PORTER, Ross J.; KALLA, Rahul; HO, Gwo-Tzer. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. **F1000Research**, v. 9, p. F1000 Faculty Rev-294, 2020.
- POULOGIANNIS, George *et al.* Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. **The Journal of Pathology**, v. 220, n. 3, p. 338–347, fev. 2010.
- PRASOODANAN P. K., Vishnu *et al.* Western and non-western gut microbiomes reveal new roles of Prevotella in carbohydrate metabolism and mouth–gut axis. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, p. 77, 7 out. 2021.
- PRATT, Molly *et al.* Colorectal Cancer Screening in Inflammatory Bowel Diseases—Can Characterization of GI Microbiome Signatures Enhance Neoplasia Detection? **Gastroenterology**, v. 162, n. 5, p. 1409–1423.e1, 1 abr. 2022.
- PRINCE, Benjamin T. *et al.* Gut Microbiome and the Development of Food Allergy and Allergic Disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 6, p. 1479–1492, dez. 2015.
- QADERI, Seyed M. *et al.* Disease recurrence after colorectal cancer surgery in the modern era: a population-based study. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 36, n. 11, p. 2399–2410, 1 nov. 2021.
- QUAGLIO, Ana Elisa Valencise *et al.* Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 30, p. 4053–4060, 14 ago. 2022a.
- QUAGLIO, Ana Elisa Valencise *et al.* Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 30, p. 4053–4060, 14 ago. 2022b.

QUIGLEY, Eamonn M. M. Gut bacteria in health and disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 9, p. 560–569, set. 2013.

RA, Hannah *et al.* Clinicopathological Differences between Right and Left Colorectal Cancer by Sex. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 10, p. 2810, 10 maio 2024.

REIS, Sandra Aparecida Dos; DA CONCEIÇÃO, Lisiane Lopes; PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia. Intestinal microbiota and colorectal cancer: changes in the intestinal microenvironment and their relation to the disease. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1391–1407, out. 2019.

REMONATTO, Gabriela *et al.* Integrated molecular profiling of RAS, BRAF mutations, and mismatch repair status in advanced colorectal carcinoma: insights from gender and tumor laterality. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 15, n. 4, p. 1580–1591, 31 ago. 2024.

REN, Minhong *et al.* Succession Analysis of Gut Microbiota Structure of Participants from Long-Lived Families in Hechi, Guangxi, China. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2524, 7 dez. 2021.

REZENDE, Leandro Fórniás Machado de *et al.* Physical activity and cancer: an umbrella review of the literature including 22 major anatomical sites and 770 000 cancer cases. **British Journal of Sports Medicine**, v. 52, n. 13, p. 826–833, 1 jul. 2018.

RICHARD, Mathias L. *et al.* Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. **Gut Microbes**, v. 9, n. 2, p. 131–142, 4 mar. 2018.

RICHARD, Mathias L.; SOKOL, Harry. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 6, p. 331–345, jun. 2019.

RINNINELLA, Emanuele *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 10 jan. 2019.

ROSHANI, Rozita; MCCARTHY, Fiona; HAGEMANN, Thorsten. Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 157–163, 10 abr. 2014.

RUBIN, Joseph E.; PITOUT, Johann D. D. Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1, p. 10–18, 14 maio 2014.

RUBINSTEIN, Mara Roxana *et al.* Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 2, p. 195–206, 14 ago. 2013.

RYU, Seoung Woo *et al.* Gut Microbiota Eubacterium callanderi Exerts Anti-Colorectal Cancer Activity. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, p. e02531-22, 30 nov. 2022.

SADEGHI, Mohammad; MESTIVIER, Denis; SOBHANI, Iradj. Contribution of pks+ Escherichia coli (E. coli) to Colon Carcinogenesis. **Microorganisms**, v. 12, n. 6, p. 1111, jun. 2024.

SALMON, Hélène *et al.* Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 899–910, mar. 2012.

SAMADI, Mahmoud *et al.* Cancer immunotherapy focusing on the role of interleukins: A comprehensive and updated study. **Pathology - Research and Practice**, v. 249, p. 154732, 1 set. 2023.

SANDLER, Robert S. Epidemiology and Risk Factors for Colorectal Cancer. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 717–735, 1 dez. 1996.

SANTA HELENA, Francielle Grivot *et al.* Atuais diretrizes do rastreamento do câncer colorretal: revisão de literatura. **Rev. AMRIGS**, p. 76–83, 2017.

SANTOS JR., Júlio César M. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais II - câncer colorretal - fatores de riscos e prevenção. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 459–473, dez. 2007.

SANTOS, Vanessa Sardinha. **Colostomia**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/saude/colostomia.htm>>. Acesso em: 3 jan. 2024.

SARHADI, Virinder *et al.* Gut Microbiota and Host Gene Mutations in Colorectal Cancer Patients and Controls of Iranian and Finnish Origin. **Anticancer Research**, v. 40, n. 3, p. 1325–1334, 1 mar. 2020.

SCHIEHL, Gabriela *et al.* Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80+CD11b^{high}Gr1^{low} macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 5, p. 1692–1708, 2 maio 2011.

SCHOENBORN, Jamie R.; WILSON, Christopher B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, v. 96, p. 41–101, 2007.

SCHREIBER, Robert D.; OLD, Lloyd J.; SMYTH, Mark J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 25 mar. 2011.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **The Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379–423, jul. 1948.

SHIMPOH, Takayuki *et al.* Prevalence of pks-positive Escherichia coli in Japanese patients with or without colorectal cancer. **Gut Pathogens**, v. 9, p. 35, 2017.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 3, p. 177–193, 6 maio 2017.

SIGNAT, Benoit *et al.* Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 13, n. 2, p. 25–36, 2011.

SILVA, Ana *et al.* Impact of adiposity on staging and prognosis of colorectal cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 145, p. 102857, jan. 2020.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688–688, abr. 1949.

SMITH, Robert A. *et al.* Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 3, p. 184–210, maio 2019.

SOBHANI, Iradj *et al.* Colorectal cancer-associated microbiota contributes to oncogenic epigenetic signatures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 48, p. 24285–24295, 26 nov. 2019.

SONG, Mingyang; CHAN, Andrew T.; SUN, Jun. Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 158, n. 2, p. 322–340, 1 jan. 2020.

STANILOV, N. S.; DOBREVA, Z. G.; STANILOVA, S. A. Higher TNF-Alpha Production Detected in Colorectal Cancer Patients Monocytes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 26, n. sup1, p. 107–110, 1 jan. 2012.

STAPPENBECK, Thaddeus S.; VIRGIN, Herbert W. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 191–199, 9 jun. 2016.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SUTTON, Thomas D. S.; HILL, Colin. Gut Bacteriophage: Current Understanding and Challenges. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 2019.

SZOSTEK, Julia *et al.* Right-Sided Versus Left-Sided Colon Cancer—A 5-Year Single-Center Observational Study. **Cancers**, v. 17, n. 3, p. 537, 5 fev. 2025.

SZYCHOWIAK, Piotr *et al.* The role of the microbiota in the management of intensive care patients. **Annals of Intensive Care**, v. 12, n. 1, p. 3, 5 jan. 2022.

TANNOCK, G. W. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 4, p. S44–S49, dez. 2002.

TEMRAZ, Sally *et al.* Treatment sequencing of metastatic colorectal cancer based on primary tumor location. **Seminars in Oncology**, v. 48, n. 2, p. 119–129, 1 abr. 2021.

THOMAS, Andrew Maltez *et al.* Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. **Nature Medicine**, v. 25, n. 4, p. 667–678, abr. 2019.

TILG, Herbert *et al.* The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. **Cancer Cell**, v. 33, n. 6, p. 954–964, 11 jun. 2018.

TJALSMA, Harold *et al.* A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 575–582, 25 jun. 2012.

TOPRAK, N. Ulger *et al.* A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 8, p. 782–786, 1 ago. 2006.

UNGARO, Ryan *et al.* Ulcerative colitis. **Lancet (London, England)**, v. 389, n. 10080, p. 1756–1770, 29 abr. 2017.

URMI, Roy *et al.* Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells. **Cell reports**, v. 21, n. 4, 24 out. 2017.

VÁZQUEZ-CASTELLANOS, Jorge F. *et al.* Comparison of different assembly and annotation tools on analysis of simulated viral metagenomic communities in the gut. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 37, 18 jan. 2014.

VEBR, Marek *et al.* A Narrative Review of Cytokine Networks: Pathophysiological and Therapeutic Implications for Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. **Biomedicines**, v. 11, n. 12, p. 3229, dez. 2023.

VERDAM, Froukje J. *et al.* Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 21, n. 12, p. E607-615, dez. 2013.

VERNIA, Filippo *et al.* Dietary Factors Modulating Colorectal Carcinogenesis. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 143, jan. 2021.

VESTBY, Lene K. *et al.* Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, fev. 2020.

WANG, Lu *et al.* Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. **Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 35, n. 4, p. 273–280, abr. 2015.

WANG, Si-Yi *et al.* Butyrate suppresses abnormal proliferation in colonic epithelial cells under diabetic state by targeting HMGB1. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 139, n. 4, p. 266–274, abr. 2019.

WANG, Xiumin; LI, Ting. Chapter 4 - Current problems with the antibiotic-resistant bacteria and multiresistance bacteria. *In*: SINGH, Pardeep; SILLANPÄÄ, Mika (Orgs.). **Degradation of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Various Sources**. Developments in Microbiology. [S.l.]: Academic Press, 2023. p. 89–115.

WANG, Y. *et al.* Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 5, p. 1106–1115, set. 2014.

WEI, Hua *et al.* Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 3, p. 577–586, 1 set. 2010.

WEST, Nathan R. *et al.* Emerging cytokine networks in colorectal cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 615–629, out. 2015.

WHIFFIN, Nicola *et al.* Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 17, p. 4729–4737, 1 set. 2014.

WILLIS, Amy D. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 23 out. 2019.

WONG, Chi Chun; YU, Jun. Gut microbiota in colorectal cancer development and therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 20, n. 7, p. 429–452, jul. 2023.

WONG, Martin C. S. *et al.* Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, v. 19, n. 5, p. 955–966.e61, maio 2021.

WU, Shaoguang *et al.* Bacteroides fragilis enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. **Gastroenterology**, v. 124, n. 2, p. 392–400, fev. 2003.

WU, Shaoguang *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. **Nature Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1016–1022, set. 2009.

XU, Hui *et al.* Therapeutic potential of *Clostridium butyricum* anticancer effects in colorectal cancer. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, p. 2186114, 2023.

XU, Long-feng *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103698, 1 ago. 2014.

XU, Siyang *et al.* Foes or Friends? Bacteria Enriched in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 372, 6 fev. 2020.

XU, Song *et al.* Prevotellaceae Modulates Colorectal Cancer Immune Microenvironment to Assist Anti-PD-L1 Immunotherapy. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 35, n. 12, p. 909–921, 1 dez. 2024.

YANG, Bo *et al.* The role of cytokine and immune responses in intestinal fibrosis. **Journal of Digestive Diseases**, v. 21, n. 6, p. 308–314, 2020.

YANG, Chien-Yi *et al.* Outcomes of right-sided and left-sided colon cancer after curative resection. **Scientific Reports**, v. 12, p. 11323, 5 jul. 2022.

YANG, Jinho *et al.* Development of a colorectal cancer diagnostic model and dietary risk assessment through gut microbiome analysis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 10, p. 1–15, out. 2019.

YOO, Ji Youn *et al.* Gut Microbiota and Immune System Interactions. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1587, 15 out. 2020.

ZACKULAR, Joseph P. *et al.* The Human Gut Microbiome as a Screening Tool for Colorectal Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 11, p. 1112–1121, 2 nov. 2014.

ZAYTSEVA, Yekaterina. Lipid Metabolism as a Targetable Metabolic Vulnerability in Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 301, 15 jan. 2021.

ZEKI, Sebastian S.; GRAHAM, Trevor A.; WRIGHT, Nicholas A. Stem cells and their implications for colorectal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 90–100, fev. 2011.

ZELLER, Georg *et al.* Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. **Molecular Systems Biology**, v. 10, n. 11, p. 766, nov. 2014.

ZHANG, Kexin *et al.* *Clostridium butyricum* inhibits epithelial–mesenchymal transition of intestinal carcinogenesis through downregulating METTL3. **Cancer Science**, v. 114, n. 8, p. 3114–3127, 26 maio 2023.

ZHENG, Jingxian *et al.* IL-6, TNF- α and IL-12p70 levels in patients with colorectal cancer and their predictive value in anti-vascular therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 26 set. 2022.

ZHU, Wenhan *et al.* Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. **Nature**, v. 553, n. 7687, p. 208–211, 11 jan. 2018.

ZHU, Wenhan *et al.* Editing of the gut microbiota reduces carcinogenesis in mouse models of colitis-associated colorectal cancer. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 10, p. 2378–2393, 7 out. 2019.

17 APÊNDICES

17.1 APÊNDICE I - 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)



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 em 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)



17.2 APÊNDICE II - Instrumento 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 () Não			
Tabagismo? : () Sim () Não Consumo de álcool? : () Sim () Não			
Consumo de comidas industrializadas: () Sim () Não			
Frequência/Semana () 1 a 7 () não sabe () + 7			
Come muita carne vermelha/processada (salsicha, calabresa, linguiça): : () Sim () Não			
Frequência/Semana () 1 a 7 () não sabe () + 7			
Consumo de carne salgada: () Sim () Não			
Frequência/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		

Page 1 of 7





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? _____



T0 _____

T1 _____

IV - Avaliação de instabilidade de microssatélites

V - Perfil Imune

T0 _____

T1 _____

VI - Avaliação da Microbiota Intestinal

T0 _____

T1 _____



• EORTC QLQ-C30 (version 3)

Gostaríamos de conhecer alguns pormenores sobre si e a sua saúde. Responda você mesmo/a, por favor, a todas as perguntas fazendo um círculo à volta do número que melhor se aplica ao seu caso. Não há respostas certas nem erradas. A informação fornecida é estritamente confidencial.

Escreva as iniciais do seu nome:

--	--	--	--	--

data de nascimento (dia, mês, ano):

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

A data de hoje (dia, mês, ano):

31

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	Não	Um pouco	Bastante	Muito
1. Custa-lhe fazer esforços mais violentos, por exemplo, carregar um saco de compras pesado ou uma mala?	1	2	3	4
2. Custa-lhe percorrer uma <u>grande</u> distância a pé?	1	2	3	4
3. Custa-lhe dar um <u>pequeno</u> passeio a pé, fora de casa?	1	2	3	4
4. Precisa de ficar na cama ou numa cadeira durante o dia?	1	2	3	4
5. Precisa que o/a ajudem a comer, a vestir-se, a lavar-se ou a ir à casa de banho?	1	2	3	4
Durante a última semana :				
6. Sentiu-se limitado/a no seu emprego ou no desempenho das suas actividades diárias?	1	2	3	4
7. Sentiu-se limitado/a na ocupação habitual dos seus tempos livres ou noutras actividades de lazer?	1	2	3	4
8. Teve falta de ar?	1	2	3	4
9. Teve dores?	1	2	3	4
10. Precisou de descansar?	1	2	3	4
11. Teve dificuldade em dormir?	1	2	3	4
12. Sentiu-se fraco/a?	1	2	3	4
13. Teve falta de apetite?	1	2	3	4
14. Teve enjoos?	1	2	3	4
15. Vomitou?	1	2	3	4

Por favor, passe à página seguinte

Page 4 of 7



Durante a última semana :

	Não	Um pouco	Bastante	Muito
16. Teve prisão de ventre?	1	2	3	4
17. Teve diarreia?	1	2	3	4
18. Sentiu-se cansado/a?	1	2	3	4
19. As dores perturbaram as suas actividades diárias?	1	2	3	4
20. Teve dificuldade em concentrar-se, por exemplo, para ler o jornal ou ver televisão?	1	2	3	4
21. Sentiu-se tenso/a?	1	2	3	4
22. Teve preocupações?	1	2	3	4
23. Sentiu-se irritável?	1	2	3	4
24. Sentiu-se deprimido/a?	1	2	3	4
25. Teve dificuldade em lembrar-se das coisas?	1	2	3	4
26. O seu estado físico ou tratamento médico interferiram na sua vida <u>familiar</u> ?	1	2	3	4
27. O seu estado físico ou tratamento médico interferiram na sua actividade <u>social</u> ?	1	2	3	4
28. O seu estado físico ou tratamento médico causaram-lhe problemas de ordem financeira?	1	2	3	4

Nas perguntas que se seguem faça um círculo à volta do número, entre 1 e 7, que melhor se aplica ao seu caso

29. Como classificaria a sua saúde em geral durante a última semana?

1 2 3 4 5 6 7
Péssima Óptima

30. Como classificaria a sua qualidade de vida global durante a última semana?

1 2 3 4 5 6 7
Péssima Óptima

© Copyright 1995 EORTC Study Group on Quality of Life. Todos os direitos reservados. Version 3.0.

Page 5 of 7



• EORTC QLQ – CR29 (Anexo 16.2).

Os pacientes às vezes relatam que têm os seguintes sintomas ou problemas.

Por favor, indique o até que ponto você experimentou esses sintomas ou problemas durante a semana anterior.

Por favor responda circulando o número que melhor se aplica a você.

Durante a semana passada:	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
1 Você urinou com frequência durante o dia?	1	2	3	4
2 Você urinou com frequência durante a noite?	1	2	3	4
3 Você teve alguma liberação não intencional (vazamento) de urina?	1	2	3	4
4 Você sentiu dor ao urinar?	1	2	3	4
5 Você sentiu dor abdominal?	1	2	3	4
6 Você sentiu dor nas nádegas / região anal / reto?	1	2	3	4
7 Você teve uma sensação de inchaço no abdômen?	1	2	3	4
8 Você teve sangue nas fezes?	1	2	3	4
9 Você teve muco nas fezes?	1	2	3	4
10 Você ficou com a boca seca?	1	2	3	4
11 Você perdeu cabelo como resultado do tratamento?	1	2	3	4
12 Você teve problemas com o seu paladar?	1	2	3	4

Durante a semana passada:	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
13 Você estava preocupado com sua saúde no futuro?	1	2	3	4
14 Você se preocupou com seu peso?	1	2	3	4
15 Você se sentiu fisicamente menos atraente como resultado de sua doença?	1	2	3	4
16 Você tem se sentido menos feminina /masculino como o resultado de sua doença ou tratamento?	1	2	3	4
17 Você está insatisfeito (a) com seu corpo?	1	2	3	4
18 Você tem bolsa de estoma (colostomia / ileostomia)? (circule a resposta correta)		Sim	Não	



Durante a semana passada:	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
Responda a estas perguntas				
SOMENTE SE VOCÊ TIVER UMA BOLSA DE ESTOMA , se não, continue abaixo:				
19 Você teve liberação não intencional de gás / flatulência de sua bolsa para estoma?	1	2	3	4
20 Você teve vazamento de fezes da bolsa de estoma?	1	2	3	4
21 Você teve feridas na pele ao redor do seu estoma?	1	2	3	4
22 Mudanças frequentes ocorreram na bolsa de estoma durante o dia?	1	2	3	4
23 Mudanças frequentes ocorreram na bolsa de estoma durante a noite?	1	2	3	4
24 Você se sentiu envergonhado (a) por causa da bolsa de estoma?	1	2	3	4
25 Você teve problemas para cuidar da bolsa de estoma?	1	2	3	4

Durante a semana passada:	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
Responda a estas perguntas				
SOMENTE SE VOCÊ NÃO TIVER UMA SACOLA DE ESTOMA:				
26 Você teve liberação não intencional de gás / flatulência ?	1	2	3	4
27 Você teve vazamento de fezes ?	1	2	3	4
28 Você já sentiu feridas na pele ao redor da região anal?	1	2	3	4
29 Os movimentos intestinais frequentes ocorreram durante o dia?	1	2	3	4
30 Os movimentos intestinais frequentes ocorreram durante a noite?	1	2	3	4
31 Você se sentiu envergonhado (a) por causa do movimento do intestino?	1	2	3	4

Durante as últimas 4 semanas Não Pouco Moderadamente Muito

Somente para Homens				
32 Até que ponto você estava interessado em sexo?	1	2	3	4
33 Você teve dificuldade em obter ou manter uma ereção?	1	2	3	4

Somente para as Mulheres				
34 Até que ponto você estava interessado em sexo?	1	2	3	4
35 Você sentiu dor ou desconforto durante a relação sexual?	1	2	3	4



17.3 APÊNDICE III - Termo de Composição Biorrepositório



TERMO DE COMPOSIÇÃO BIORREPOSITÓRIO

O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa *"ANÁLISE DO ESPECTRO MOLECULAR E CLÍNICO DO CÂNCER COLORRETAL: DA EPIDEMIOLOGIA E QUALIDADE DE VIDA À GENÉTICA E ANÁLISES ÔMICAS"*, a ser gerenciado pelos pesquisadores sob orientação da Pesquisadora Responsável: Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins e Pesquisador Corresponsável: Dr. George Allan Villarouco da Silva, conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto nas Resoluções n 441/11 e n 466/12, ambas do CNS. Com participação da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON Rua Francisco Orellana nº 215 – Planalto Manaus-AM / CEP: 69040-010 Fone: (92) 3655-4600.

- 1) O Biorrepositório, constituído por amostras de: **tecido fresco tumoral, sangue total e material fecal**, atenderá às normas das Resolução CNS 441/2011 e Portaria MS 2.201/11 e será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular, este faz parte do Laboratório de Análises Clínicas da FCECON – localizado na Rua Francisco Orellana, 215 - segundo andar, bairro Planalto, Cep: 69040-010, Manaus - AM.
- 2) O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido congelados a -30°C em Freezer Laboratorial 3349/FV Marca: Fanem até sua utilização;
- 3) O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON (4 anos).
- 4) As instituições acordantes, devidamente representadas, poderão ter acesso aos dados e materiais obtidos em decorrência da execução do projeto, durante sua vigência, mediante solicitação aos membros da equipe do projeto;
- 5) A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente cadastrados na Plataforma Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Projeto de Pesquisa e mediante aprovação da análise de ética;
- 6) Havendo a retirada ou desistência por parte do participante da pesquisa, referente à amostra coletada

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas – FCECON
Rua Francisco Orellana nº 215 – Planalto
Manaus-AM / CEP: 69040-010
Fone: (92) 3655-4600
diretoria@fcon.am.gov.br
www.fcon.am.gov.br

Page 1 of 2



e armazenada, deverá o pesquisador e a instituição que mantém a guarda disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso, será facultado ao participante da pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;

7) Em caso de dissolução da parceria entre as instituições durante a vigência do projeto, a partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo que deverá ser submetido à análise de ética dos Comitês de Ética Institucionais;

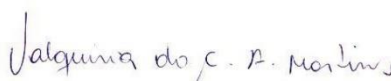
8) Em caso de encerramento do projeto de pesquisa, havendo interesse de uso futuro das amostras do Biorrepositório e quando autorizado pelo participante da pesquisa em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o pesquisador responsável pelo projeto deverá manifestar seu interesse por escrito e assinado pelos pesquisadores e instituições parceiras. Assim que o novo projeto ou a emenda do projeto for aprovada pelo cep, os participantes da pesquisa devem ser informados e assinar o novo TCLE se for o caso. A partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo entre as instituições, que deverá ser submetido à análise dos Comitês de Ética em Pesquisa envolvidos e após aprovados o participante da pesquisa deve ser informado (resolução 441/2011 do cns);"

9) Para uso futuro das amostras em nova pesquisa, em atendimento ao disposto na Resolução n 441/2011 do CNS, deverá haver submissão de novo Projeto de Pesquisa ao Sistema CEP/CONEP;

10) Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão incinerados ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da Cláusula 8;

12) Os casos não contemplados pelo presente Termo de Constituição do Biorrepositório serão submetidos à análise conjunta dos acordantes e resolvidos de comum acordo pelas partes envolvidas.

Manaus, 30 de agosto de 2021




Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins
Pesquisadora Responsável
alvesvalquiria@yahoo.com.br
(92) 98128-6213



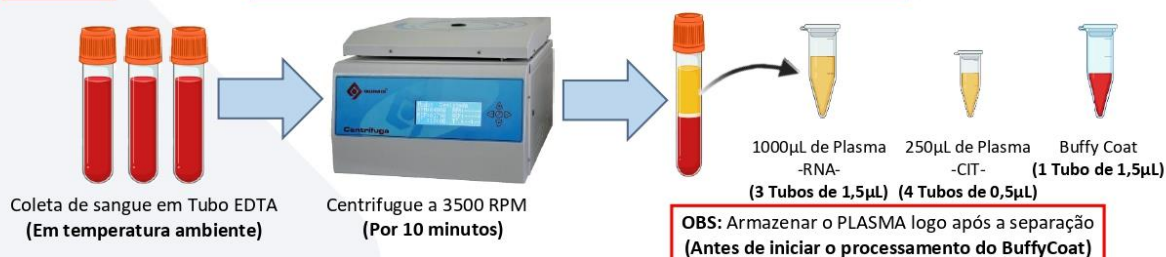
17.4 APÊNDICE IV – Protocolo de separação de plasma e buffycoat



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP			Página: 1
	Data Emissão Maio/2023	Prazo de Vigência 02 ANOS	Próxima Revisão Maio/2025	Versão 01/2023
Elaborado por: Jhonnatan Silva de Souza		Revisado por: Valquíria do Carmo Alves Martins		Aprovado por: Kátia Luz Torres Silva
ÁREA EMITENTE: LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR / FCECON				
ASSUNTO: Separação de Plasma e Buffy Coat				

FASE 1

Obs: Iniciar procedimento no prazo limite de 2 horas após a coleta!

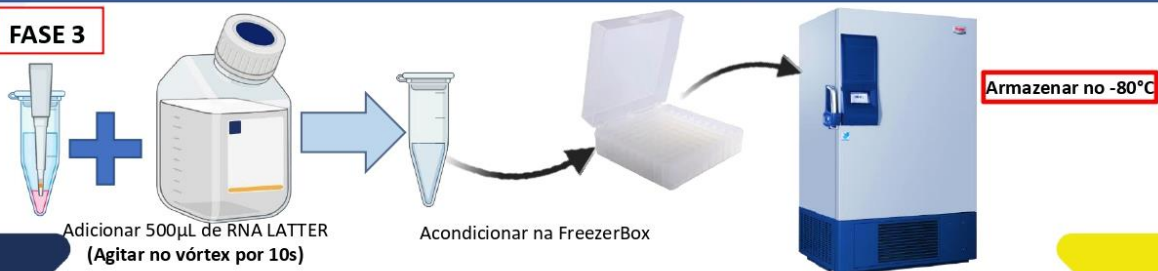


FASE 2

Lavagem do Buffy Coat com o Tampão de Lise (REPETIR 3X)



FASE 3



www.fcecon.am.gov.br
facebook.com/fcecon.am
instagram.com/fcecon.am/

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas – FCECON
Rua Francisco Orellana, nº 215 – Planalto
Fone: (92) 3655-4600
Manaus – AM / CEP: 69040-010



17.5 APÊNDICE V – Protocolo de quantificação das citocinas por *Cytometric Bead Array* – CBA

- 1) Verificar o número de amostras a ser feita;

Observação: O Kit faz aproximadamente 200 testes, ou seja, 180 amostras e 2 curvas de calibração. É possível otimizar o Kit no meio, portanto, dá para fazer 2 experimentos com 90 amostras cada.

- 2) Separar as amostras em alíquotas de 100 µL em microtubos menores;

Observação: Para alíquotar as amostras, descongelar no banho maria (37 °C) e centrifugar por 10 min. a 14.000 rpm. Retirar o sobrenadante e colocar em microtubos menores. É importante realizar a manipulação das amostras em uma cabine de fluxo laminar para não haver contaminação.

- 3) Colocar novamente as amostras no freezer;
- 4) Identificar os tubos das amostras a serem utilizadas. É preferível utilizar números sequenciais para facilitar o procedimento. (ex: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ...);
- 5) Identificar um tubo para o controle negativo com a sigla “CN”;
- 6) Identificar um tubo para fazer o pool de BEADS (citocinas) com a sigla “BD”;
- 7) Identificar os 9 tubos da curva padrão para fazer a diluição. Identificar todos com o número 1 e sua respectiva concentração e diluição;
- 8) Identificar os outros 9 tubos da curva padrão para fazer a reação para a leitura no citômetro. Identificar todos com o número 2 e sua respectiva concentração e diluição.
- 9) Calcular quanto vai se gastar de cada BEAD. Exemplo: para realizar 08 amostras.

Exemplo de cálculo:

08 Amostras

09 Curva

01 CN

I. 2 tubos (segurança) – Para não faltar reagente 20 tubos

II. 20 tubos x 25 (quantidade do pool de BEADS que eu vou colocar em cada tubo) = 500

III. 500 / 07 (Número de BEADS que vou utilizar) = 72 µL

IV. Vou pegar 72 µL de cada BEAD.

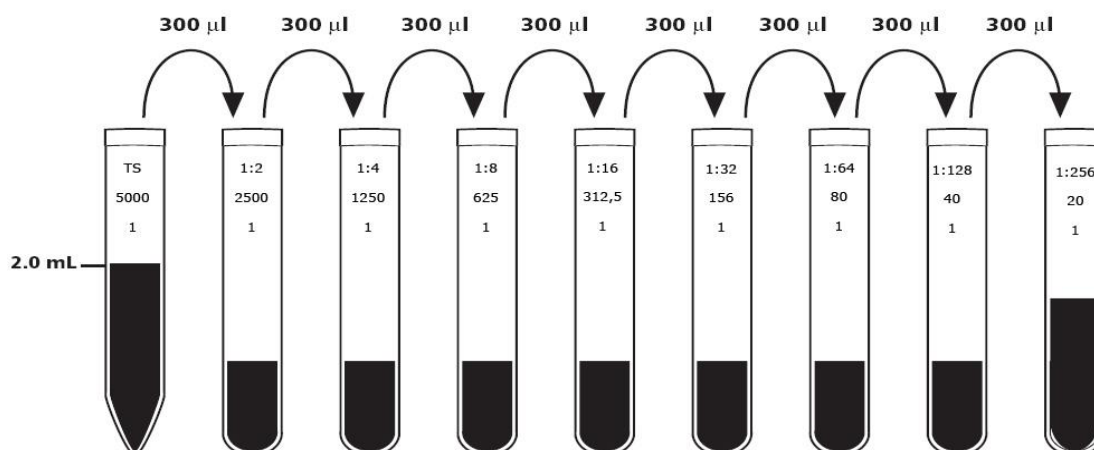
***Guardar todos os tubos em estantes e protegidos da poeira**

- Preparo das amostras e Reagentes “G” e “F” (Dia do experimento)

- I. Descongelar as amostras em banho maria (37°C). Centrifugar por 10 min. a 14.000 rpm. Utilizar este mesmo procedimento se precisar diluir as amostras, caso seja necessário. Utilizar o REAGENTE G do kit para diluição.
- II. Colocar os Reagentes G e F em tubo Falcon e centrifugar por 10 min. a 2.000 rpm.
Observação: É importante aliquotar os reagentes no fluxo laminar para não contaminar, ainda mais se for usar novamente o kit.
- III. Retirar os tubos identificados e deixar todos prontos para o início do experimento, separar pipetas, ponteiros, descartes, etc.

- **Preparo dos Padrões**

- I. Reconstituir o padrão 15 minutos antes de começar o experimento. O padrão deve ser reconstituído com 2,0 ml do REAGENTE G. Após abrir o padrão, colocar 1,0 ml do REAGENTE G e agitar bem lentamente e com movimentos circulares por uns 5 minutos. Colocar mais 1000 µL do REAGENTE G e continuar mexendo bem suavemente. Com uma pipeta, passar o padrão para o TUBO TS “1”. Colocar mais 1,0 ml (REAG. G) para lavar o recipiente do padrão e com a pipeta transferir para o TUBO TS “1” Repetir o procedimento com mais 1000 µL (REAG. G). Por 15 minutos ficar mexendo bem suavemente de tempo em tempo para solubilizar bem. OBS: Nunca agitar no vórtex o padrão e nem agitar fortemente.
- II. Colocar 300 µL do REAGENTE G em cada tubo da curva de diluição “1” exceto no tubo TS (tubo com as citocinas liofilizadas) que está com o padrão. Fazer as diluições sucessivas conforme exemplo abaixo:



Observação: No tubo CN colocar apenas o REAGENTE “G”.

- **Preparo do pool de BEADS**

- I. Pegar o cálculo de quanto você vai precisar utilizar das BEADS (Ex: 72 µL);
- II. Colocar 72 µL de cada BEAD (reagentes A1 – A5 do kit) no Tubo “BD”.
Observação: Agitar no vórtex as BEADS toda vez que for tirá-las. Se demorar a tirar, vortexar novamente.
- III. Utilizaremos 25 µL do pool de BEADS para cada tubo de amostra, curva de diluição “2” e controle negativo (CN).

- **Execução das reações**

- I. Colocar 25 µL do pool de BEADS em cada tubo da curva de diluição “2”. Não esquecer de agitar as BEADS no vórtex de tempo em tempo;
- II. Colocar 25 µL do pool de BEADS em todos os tubos das amostras e no tubo CN, sempre agitar as BEADS no vórtex;
- III. Colocar 25 µL do padrão dos tubos da curva de diluição “1” nos tubos da curva de diluição “2”. Colocar respeitando as respectivas diluições;
- IV. Colocar 25 µL de amostra nos seus respectivos tubos. É importante pegar somente o sobrenadante dos tubos;
- V. Colocar 25 µL do REAGENTE “G” no tubo CN;
- VI. Colocar 25 µL do REAGENTE “B” (anticorpo de detecção) em cada tubo. Tanto nos tubos da curva de diluição “2”, quanto nos das amostras e CN;
- VII. Agitar todos os tubos no vórtex por 30 segundos;
- VIII. Incubar por 3h à T.A. e ao abrigo da luz;
- IX. Após incubação, adicionar 1 mL do REAGENTE “F” em cada tubo;
- X. Centrifugar os tubos por 5 min. a 1.500 rpm, 20°C;

- XI.** Verter os tubos e adicionar 200 μ L do REAGENTE “F” em cada tubo;
- XII.** Agitar todos os tubos no vórtex por 30 segundos para proceder à leitura
- **Execução das reações**
 - I.** Identificar um tubo para o Setup Beads com a sigla “Setup”;
 - II.** Colocar 50 μ L do Cytometer Setup Beads no tubo.
Observação: Agitar o frasco no vórtex com Cytometer Setup Beads antes de tirá-las;
 - III.** Colocar 450 μ L de “Reagente F” no tubo e agitar no vórtex.
 - **Aquisição setup, padrões e amostras no citômetro**
 - I.** Criar 2 pastas: “Standard” e “Samples”. Pode adquirir todas as amostras em uma única pasta e depois separar as 10 primeiras para a pasta Standard e o restante para a Samples;
 - II.** Abrir o Template de aquisição do CBA;
 - III.** Conectar o citômetro e acionar os parâmetros do instrumento determinado após calibração do aparelho. Certificar que no item “Aquisition and Storage” a resolução do canal está em 1024;
 - IV.** Ajustar o número de eventos a serem contados para 2.100 em R1 (300 beads de cada analito);
 - V.** Colocar o nome do arquivo no item FILE com caracteres alfanuméricos. Exemplo: As iniciais de quem está fazendo o experimento e data do dia do procedimento. Ex: JP02052008.001;
 - VI.** Identificar os padrões e amostras no item SAMPLE ID. Ex: Padrões: CN; 1:256; 1:128, etc. Amostras: 01, 02, 03, etc.;
 - VII.** Assegurar que a gate R1 está delimitando todas as beads. Acionar a velocidade High;
 - VIII.** Começar a leitura com o Setup. Realizar os ajustes na voltagem que forem necessários;
 - IX.** Iniciar a aquisição da curva com o tubo CN e depois em ordem crescente de concentração dos padrões, ou seja, ler da maior diluição para a menor até o tubo TS;
 - X.** Seguir a aquisição das amostras em ordem crescente.

17.6 APÊNDICE VI - Protocolo de extração do DNA genômico da microbiota

• Processamento da amostra de fezes

- I. Foram pesadas 100mg das amostras de fezes. Em seguida, transferidas para um microtubo estéril de 2 mL e, então, adicionadas a cada tubo, 1 mL do tampão LS1 e 20 μ L de Proteinase K;
- II. Homogeneizou-se em vórtex por 2 minutos até que estejam completamente dissolvidas e em seguida, foram incubadas a 56 °C por 30 minutos para o processo de lise;
- III. Terminada a incubação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto;
- IV. Centrifugou-se as amostras a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente;
- V. Após a centrifugação, apenas os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos estéreis, os microtubos anteriores foram descartados e deu-se continuidade ao processo de extração automatizada;

• Procedimento (Extração Automatizada)

- I. Antes de começar, o equipamento foi ligado e foi-se separado o material necessário e de apoio para a realização do ensaio:
 - a) Ficha de identificação das amostras de acordo com a distribuição das placas;
 - b) Amostras previamente tratadas;
 - c) Tubos ou selos para armazenamento do DNA e RNA extraído.
- II. O plástico que envolve a placa foi recortado e aberto;
Observação: Os invólucros possuem um pré-corte para facilitar a abertura.
- III. Sem retirar o alumínio selante, foi realizado uma rápida centrifugação da placa para que todo o volume de reagentes ficasse concentrado no fundo dos poços;
- IV. Em uma cabine de segurança biológica adequada e com o mapeamento das amostras em mãos indicando a posição onde cada amostra deve ser adicionada, foi removida cuidadosamente a película de alumínio que veda a placa;
- V. Após a remoção da película de alumínio, foi adicionado entre 100-300 μ L de amostra, pré-tratada, nos poços das colunas nº 1 e 7 (em azul) contendo tampão de lise (Figura 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observação:

Os poços coloridos representam onde foram aplicadas as amostras.

Observação: A cada amostra pipetada, foi-se trocado a ponteira.

- VI. As tiras plásticas foram instaladas na parte superior do extrator automatizado de ácidos nucleicos para a proteção das hastes magnéticas.
- Nota:** Cada placa de extração foi-se utilizada 2 unidades de tiras plásticas de proteção.
- VII. Cuidadosamente, a placa foi posicionada no extrator automatizado de forma que a extremidade A1 da base se encontrasse na posição superior esquerda. A linha “A” da placa ficou voltada para a parte interior do equipamento e a linha “H” voltada para a parte fora (frente) do sistema;
- VIII. Em seguida, foi selecionado e executado o protocolo de extração “MPTAMDx” (Extracta® 16);
- IX. Após 40 minutos, com o término do processo de extração automatizada, a placa de extração foi removida do equipamento imediatamente, para evitar possível evaporação do eluído.
- X. Retirada a placa do equipamento, foram pipetadas as amostras de DNA das colunas nº 6 e 12 (em roxo) para microtubos de 0,5 mL (Figura 12);
- XI. Em microtubos estéreis de 0,5 mL, fracione o eluído em duas alíquotas e armazene o DNA em freezer -80 °C.

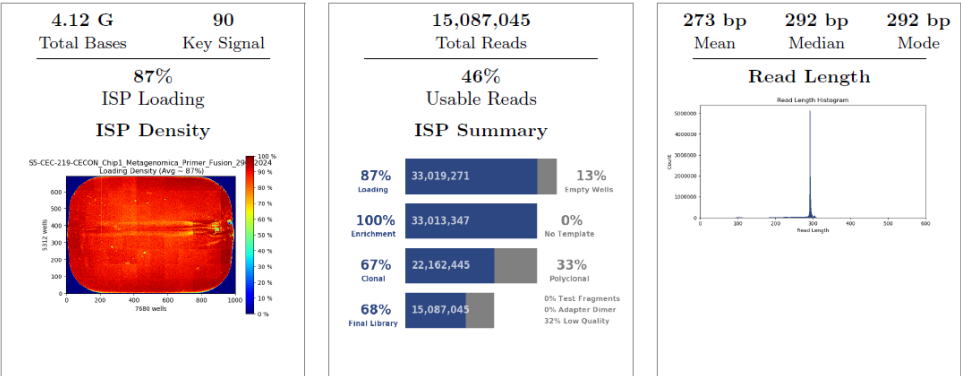
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observação:

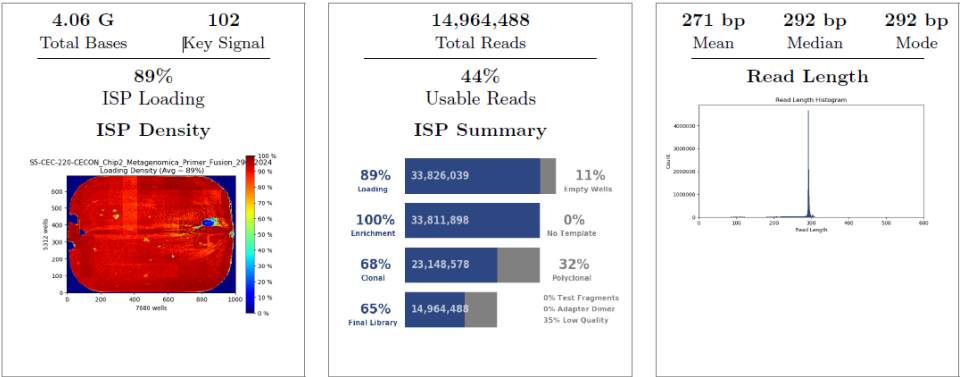
Os poços coloridos representam o local de onde as amostras foram transferidas para microtubos.

17.7 APÊNDICE VII - Resultado do processamento das reads

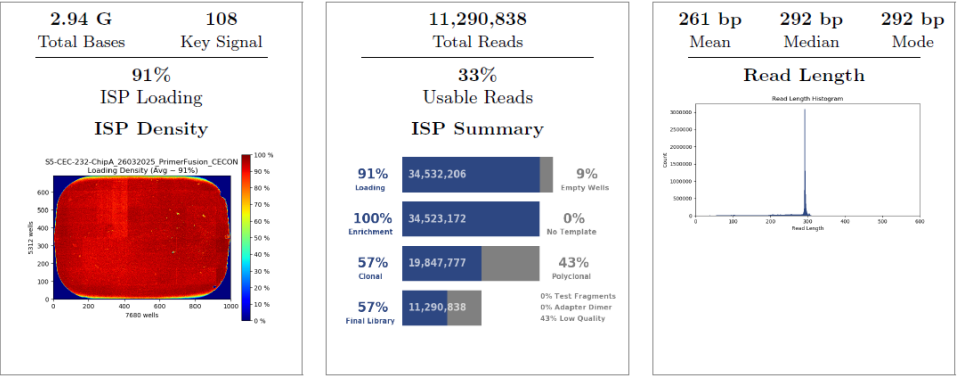
CHIP A:



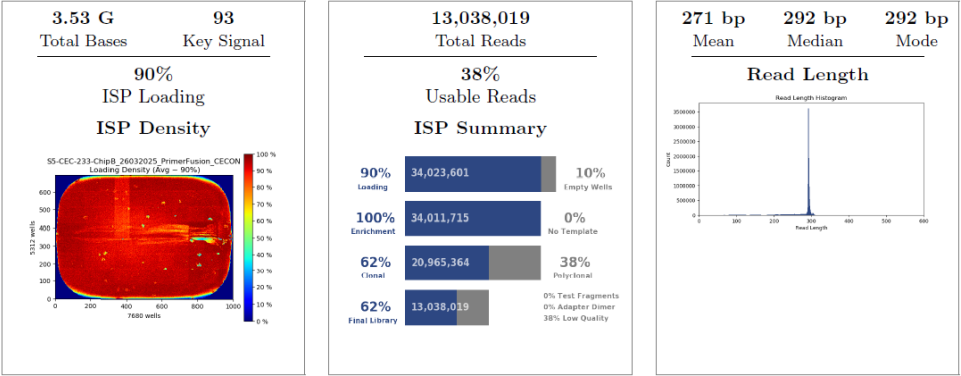
CHIP B:



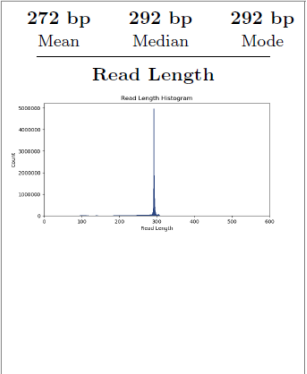
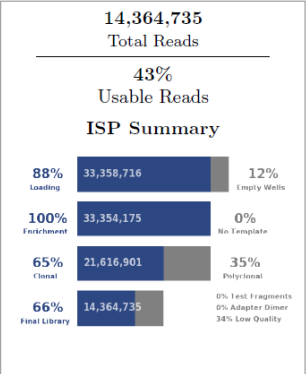
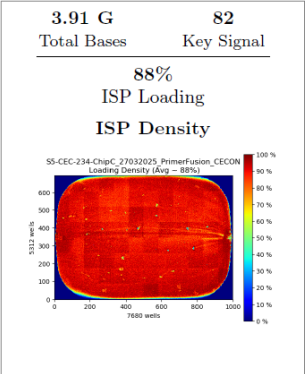
CHIP C:



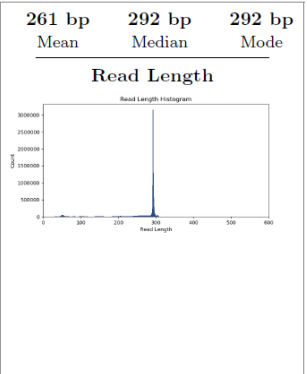
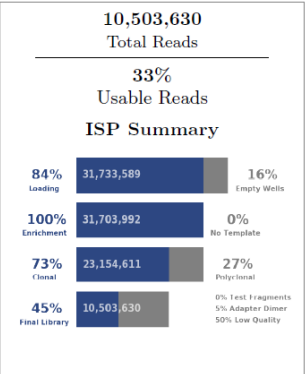
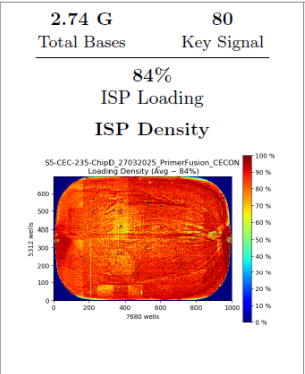
CHIP D:



CHIP E:

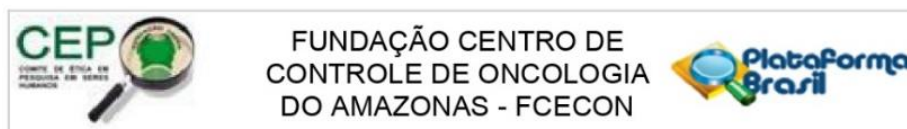


CHIP F:



18 ANEXOS

ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – FCECON)



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 sobrevivência 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



FUNDAÇÃO CENTRO DE
CONTROLE DE ONCOLOGIA
DO AMAZONAS - FCECON



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