

AValiação DA MICROBIOTA INTESTINAL E PERFIL DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS DE PACIENTES COM CâNCER COLORRETAL ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO CECON

Ronald Américo da Silva; UNINORTE, bioronaldmed@email.com;
Valquíria do Carmo Alves Martins; UFAM / FCECON;
Claudio Lucas dos Santos Catao; HEMOAM;
Allyson Guimarães da Costa; HEMOAM;
Kátia Luz Torres Silva; UFAM / FCECON;
Nayara Sousa Castro; AC Camargo / FCECON;
Jhonnatan Silva de Souza; UFAM;
Ábner Souza Paz; FCECON.

1. Introdução

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais incidente e a segunda em mortalidade globalmente, com aproximadamente 1,9 milhões de novos casos e 935 mil óbitos previstos no ano de 2020 ¹. Sua etiologia multifatorial implica cooperação entre predisposição genética, fatores ambientais, inflamação crônica e disbiose da microbiota intestinal ². A microbiota intestinal, estruturada por mais de 10^{14} microrganismos, é determinante para homeostase imunológica e metabólica, e alterações na sua composição (disbiose) estão associadas à carcinogênese colorretal por mecanismos como dano ao DNA, ativação de vias pró-inflamatórias e supressão da vigilância imune ^{3 4}.

No Brasil, o CCR apresenta taxas em tendência de alta, com 21.970 casos/ano em homens e 23.660 em mulheres, sendo a região Norte a terceira mais afetada ⁵. No Amazonas, a escassez de dados sobre o perfil molecular e microbiológico do CCR limita a operacionalização de estratégias personalizadas. A par disso, a influência de hábitos locais, como consumo elevado de carne processada e exposição a agentes infecciosos endêmicos, sobre a microbiota intestinal e a resposta imune permanece insuficientemente pesquisada ⁶.

Este estudo, visa preencher essas lacunas ao avaliar a microbiota intestinal e o perfil de mediadores imunológicos solúveis em pacientes com CCR atendidos na Fundação CECON.

2. Material e Métodos

Este estudo é parte de um projeto maior, intitulado "Análise do Espectro Molecular e Clínico do Câncer Colorretal: da Epidemiologia e Qualidade de Vida à Genética e Análises Ômicas - EMCOR", que inicialmente incluiu 194 pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de adenocarcinoma colorretal, atendidos na Fundação CECON (Manaus, Amazonas). Após triagem de elegibilidade, que excluiu 19 participantes por critérios como tratamento prévio ou dados incompletos, 173 pacientes configuraram-se considerados elegíveis. Destes, 58 indivíduos (30,5% da coorte inicial) foram incorporados para este subestudo por possuírem amostras biológicas pareadas (sangue e fezes), essenciais para análises combinadas de microbiota e mediadores imunológicos.

A abordagem aos participantes ocorreu durante consultas ambulatoriais nos serviços de Cirurgia Oncológica e/ou Endoscopia da FCECON. Após explicação detalhada dos objetivos, foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em consonância com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CAAE: 52343821.2.0000.0004). Dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos foram coletados via questionários padronizados, complementados por informações de prontuários eletrônicos, como localização tumoral (CID-10).

Para análise imunológica, 10 mL de sangue periférico foram coletados em tubos com EDTA depois da aplicação do TCLE. O plasma, isolado por centrifugação ($800 \times g$ por 10 minutos), foi armazenado a -80°C , e as concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF e IL-12p70 foram quantificadas via *BD Cytometric Bead Array* (CBA) em citômetro de fluxo *FACSCanto II*, na Fundação HEMOAM.

Para avaliação da microbiota intestinal, os participantes receberam um kit estéril (ColOFF®) com swab e solução conservante *DNA/RNA Shield*TM. As amostras fecais, coletadas pelos pacientes, foram entregues ao laboratório em uma média de ≈ 14.8 dias e armazenadas a -80°C . O DNA microbiano foi extraído de 200 mg de fezes com a utilização do kit *EXTRACTA® MPTA-PV96-B MDx*, com qualidade verificada por quantificação por fluorimetria (QubitTM 4.0) e eletroforese em gel de agarose 0,8%. A região V3-V4 do gene 16S rRNA foi amplificada com primers universais (F515/R806) e sequenciada em plataforma Ion S5 XL na sede da Thermo Fisher em São Paulo Capital.

Calcularam-se para as citocinas estatísticas descritivas (média, DP, mediana, quartis) e avaliaram-se pressupostos de normalidade por citocina com o teste de Shapiro–Wilk. Empregou-se ANOVA de medidas repetidas com correção de Greenhouse–Geisser para violação de esfericidade, seguida de comparações pareadas por t-teste com ajuste de Bonferroni. Para dados não normais, utilizou-se teste de Friedman e post-hoc de Wilcoxon pareado, igualmente corrigido por Bonferroni. Todos os testes adotaram $\alpha = 0,05$, e análises foram realizadas em R (versão 4.3.2) com pacotes rstatix, ggplot2 e FactoMineR.

3. Resultados e Discussão

Em 58 pacientes com câncer colorretal recém-diagnosticados e sem terapia prévia, a idade variou de 30 a 99 anos (média $63,7 \pm 9,6$; mediana 65). Quanto aos fatores de risco, 35 % eram tabagistas e 44,8 % relataram consumo regular de álcool, perfil que pode influenciar a resposta inflamatória. Em termos demográficos, 61,7 % se autodeclararam pardos, 20 % brancos, 13,3 % negros, 3,3 % amarelos e 1,7 % indígenas, com predomínio do sexo feminino (60 %).

A análise da microbiota de pacientes com CCR do Amazonas mostrou um conjunto característico de taxons que compõem a maior parte da comunidade microbiana fecal na coorte estudada (Figura 1). Observou-se predomínio de representantes da família *Bacteroidaceae* (diversas espécies de *Bacteroides*, incluindo *B. dorei*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*), presença consistente de *Prevotella* (incluindo *P. copri*), destaque para produtores de ácidos graxos de cadeia curta pertencentes a *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (p. ex. *Faecalibacterium* / *F. prausnitzii*), e presença recorrente, embora frequentemente pontual, de táxons associados a disbiose e potencial patogenicidade (*Enterobacteriaceae*, *Porphyromonas*, *Odoribacter*). Estes grupos aparecem tanto como constituintes relativamente estáveis do perfil agregado quanto como picos de enriquecimento em subconjuntos amostrais, configurando um cenário de heterogeneidade interindividual com sinais de disbiose compatíveis com descrições publicadas em coortes de CRC^{7,8}.

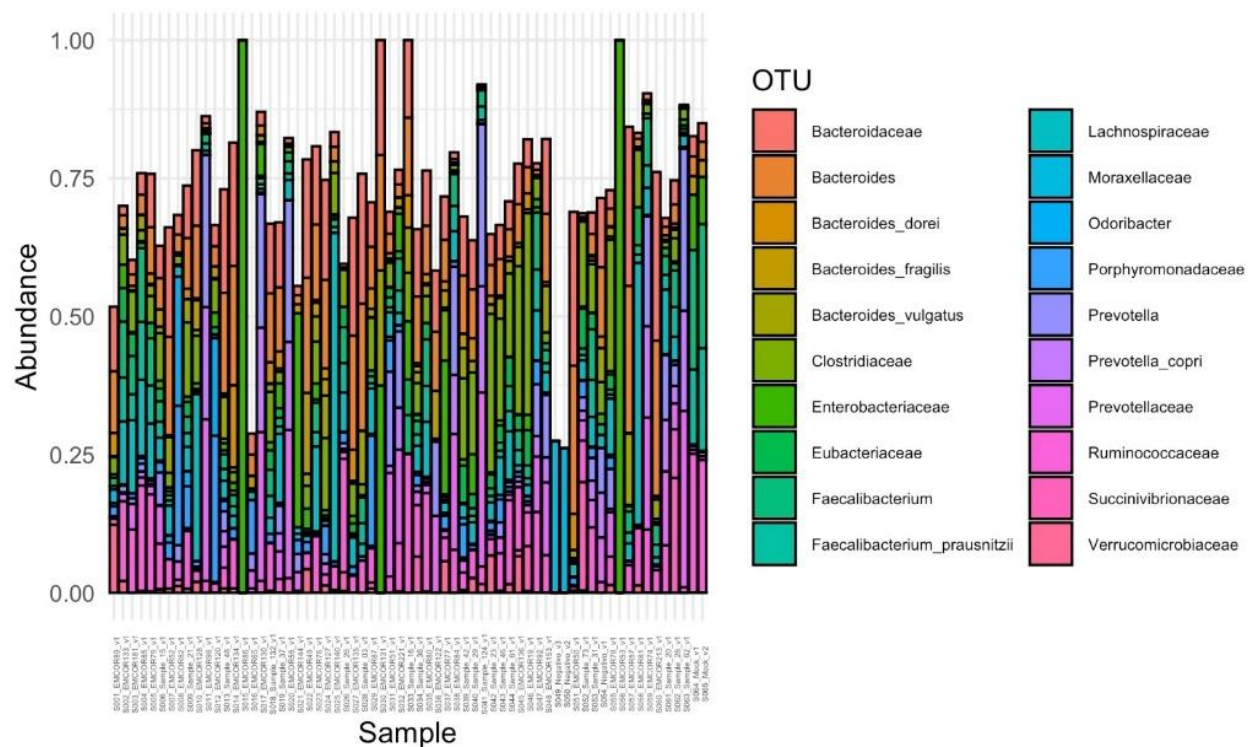


Figura 1: Abundância relativa das 20 OTUs mais representativas em amostras fecais de pacientes com câncer colorretal do Amazonas, obtidas por sequenciamento de 16S rRNA. Gráfico de barras empilhadas em que cada barra corresponde a uma amostra e as cores representam as OTUs indicadas na legenda; valores expressos em proporção relativa (0–1). OTU = *operational taxonomic unit*. Elaborado pelos autores.

As concentrações finais (CF) das dez citocinas investigadas revelaram ampla variabilidade (tabela 1). IL-8 exibiu a maior média $\pm$ DP ($29,25 \pm 49,07$ pg/mL), seguida por IL-6 ($10,98 \pm 16,90$ pg/mL). As demais citocinas oscilaram em faixas mais baixas (< 2 pg/mL), destacando-se IFN- γ ($4,27 \pm 24,78$ pg/mL) e IL-2 ($1,22 \pm 1,11$ pg/mL). Essa dispersão, especialmente nos marcadores pró-inflamatórios IL-6 e IL-8, sugere subgrupos de pacientes com resposta inflamatória mais pronunciada.

Tabela 1 – Análise Descritiva dos Valores de Concentração Final (CF), dos pacientes incluídos no estudo, na FCECON.

Citocina	n(58)	Média	DP
IFN- γ		4,27	24,78
IL-10		0,77	0,63
IL-12p70		0,35	0,94
IL-17A		0,13	0,31
IL-1 β		0,35	0,71
IL-2		1,22	1,11
IL-4		0,25	0,78
IL-6		10,98	16,90
IL-8		29,25	49,07
TNF		0,70	0,91

A análise de variância de medidas repetidas, com correção de *Greenhouse–Geisser*, confirmou diferenças estatisticamente significativas entre as médias de CF ($F_{1,58;90,12} = 15,844$; $p = 8,22 \times 10^{-6}$; $\eta^2(g) = 0,19$).

Nos testes post-hoc pareados ajustados por *Bonferroni*, 27 de 45 comparações t revelaram diferenças importantes: IL-6 e IL-8 diferiram de quase todas as demais citocinas

($p.\text{adj} \leq 0,001$), destacando-se como marcadores de maior expressividade; IL-2 também se mostrou significativamente superior a IL-4, IL-6 e IL-8; IFN- γ , IL-10 e IL-12p70 compuseram o grupo de menores concentrações, com diferenças pontuais, principalmente em relação a IL-6 e IL-8. Por sua vez, o teste de *Wilcoxon* pareado corroborou esses achados, identificando 33 comparações significativas ($p.\text{adj} < 0,05$), reforçando a distinção entre os subgrupos de alta (IL-6, IL-8, IL-2) e baixa expressividade (IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-17A).

Em pacientes recém-diagnosticados de câncer colorretal, sem qualquer terapia prévia, observamos concentrações substancialmente elevadas de IL-6 ($10,98 \pm 16,90$ pg/mL) e IL-8 ($29,25 \pm 49,07$ pg/mL), diferenciando-se de todas as demais citocinas ($p.\text{adj} \leq 0,001$). Esses achados estão em concordância com Li *et al.*, que mostraram que macrófagos liberam IL-6 e promovem sinalização autócrina em células HT-29 de câncer de cólon ⁹, e com Nagasaki *et al.*, que descreveram o papel crítico do IL-6 derivado de fibroblastos do estroma tumoral na angiogênese de tumores colorretais ¹⁰. A revisão sistemática de Bazzichetto *et al.* reforça o potencial prognóstico de IL-8 em CRC, correlacionando níveis elevados de IL-8 circulante com menor sobrevida global e progressão mais rápida ¹¹.

IL-2, com média intermediária ($1,22 \pm 1,11$ pg/mL), distinguiu-se de IL-4, IL-6 e IL-8 ($p.\text{adj} < 0,01$), sugerindo ativação precoce de respostas T-mediadas, conforme o perfil antitumoral descrito para membros da família IL-2 ⁹. Em contraste, IFN- γ ($4,27 \pm 24,78$ pg/mL) exibiu variabilidade limitada; estudos em células DLD-1 demonstram que IL-22 sinergiza com IFN- γ para indução de iNOS via STAT3, mas sem impacto clínico preponderante em pacientes sem tratamento prévio ⁹.

IL-10 apresentou baixos níveis ($0,77 \pm 0,63$ pg/mL) e seu papel permanece controverso: Rossowska *et al.* silenciaram IL-10 em modelo murino, observando inibição de crescimento tumoral e aumento da eficácia de imunoterapia baseada em CD ¹², enquanto Del Carmen *et al.* demonstraram efeito antitumoral de IL-10 produzido por lactobacilos geneticamente modificados ¹³.

IL-17A ($0,13 \pm 0,31$ pg/mL) não diferiu de IL-4 ou IFN- γ , mas estudos apontam que IL-17A promove crescimento e metástase de CRC via indução de IL-6 pela via STAT3, e altera o microambiente tumoral por modulação de quimiocinas mieloides ¹⁴.

4. Conclusões

O perfil da microbiota e do painel citocínico revela que pacientes com câncer colorretal no Amazonas apresentam disbiose caracterizada pelo enriquecimento de *Bacteroides* e *Fusobacterium* e pela redução de produtores de butirato como *Faecalibacterium* e *Roseburia*. Esse perfil microbiano associa-se a um ambiente pró-inflamatório sustentado, refletido pela elevação de IL-6 e IL-8 como marcadores de inflamação tumoral precoce e pela ativação imune inicial indicada por IL-2, enquanto IFN- γ , IL-10, IL-12p70 e IL-17A mantiveram-se estáveis. O conjunto de evidências sugere que a interação entre disbiose e inflamação contribui para a formação de um microambiente tumoral favorável à progressão da doença, reforçando o papel combinado da microbiota e das citocinas na estratificação biológica do câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Mediadores imunológicos; Microbiota intestinal.

Referências

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. maio de 2021;71(3):209–49.

2. Hofseth LJ, Hebert JR, Chanda A, Chen H, Love BL, Pena MM, et al. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. junho de 2020;17(6):352–64.
3. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. dezembro de 2020;113(12):2019–40.
4. Michaudel C, Sokol H. The Gut Microbiota at the Service of Immunometabolism. *Cell Metab*. 6 de outubro de 2020;32(4):514–23.
5. Câncer IN de. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional De Câncer; 2023. 160 p.
6. Abu-Ghazaleh N, Chua WJ, Gopalan V. Intestinal microbiota and its association with colon cancer and red/processed meat consumption. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 2021 [citado 14 de setembro de 2025];36(1):75–88. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jgh.15042>
7. Reis SAD, Da Conceição LL, Peluzio MDCG. Intestinal microbiota and colorectal cancer: changes in the intestinal microenvironment and their relation to the disease. *Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 1º de outubro de 2019 [citado 14 de setembro de 2025];68(10):1391–407. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001049>
8. Berbert L, Santos A, Magro DO, Guadagnini D, Assalin HB, Lourenço LH, et al. Metagenomics analysis reveals universal signatures of the intestinal microbiota in colorectal cancer, regardless of regional differences. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2022 [citado 14 de setembro de 2025];55:e11832. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2022000100626&tlng=en
9. Li J, Huang L, Zhao H, Yan Y, Lu J. The Role of Interleukins in Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci* [Internet]. 14 de junho de 2020 [citado 28 de julho de 2025];16(13):2323–39. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378639/>
10. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. 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. *Br J Cancer*. 21 de janeiro de 2014;110(2):469–78.
11. Bazzichetto C, Milella M, Zampiva I, Simionato F, Amoreo CA, Buglioni S, et al. Interleukin-8 in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Its Potential Role as a Prognostic Biomarker. *Biomedicine*. 19 de outubro de 2022;10(10):2631.
12. Rossowska J, Anger N, Szczygieł A, Mierzejewska J, Pajtasz-Piasecka E. Reprogramming the murine colon cancer microenvironment using lentivectors encoding shRNA against IL-10 as a component of a potent DC-based chemimmunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 28 de junho de 2018;37(1):126.
13. Del Carmen S, de Moreno de LeBlanc A, Levit R, Azevedo V, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, et al. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. *Int Immunopharmacol*. janeiro de 2017;42:122–9.
14. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med*. 6 de julho de 2009;206(7):1457–64.

Financiamento: FAPEAM – Programa PAIC