



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

JONATHAN SOUZA SARRAF

**ANÁLISE INTEGRATIVA PARA AVALIAÇÃO DE MIRNA E DE SNPS NO
PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

BELÉM
2023

JONATHAN SOUZA SARRAF

**ANÁLISE INTEGRATIVA PARA AVALIAÇÃO DE MIRNA E DE SNPS NO
PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.

BELÉM
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S247a Sarraf, Jonathan Souza.
Análise Integrativa para Avaliação de miRNA e de SNPs no
Prognóstico de Pacientes com Câncer Colorretal / Jonathan Souza
Sarraf. — 2022.
146 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. miRNA. 2. Câncer Colorretal. 3. Kras. 4. SNPs. 5.
Biomarcadores. I. Título.

CDD 576.5

JONATHAN SOUZA SARRAF

**ANÁLISE INTEGRATIVA DO IMPACTO DA EXPRESSÃO DE MIRNAS E DE
SNPS NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFPA
como requisito para obtenção do grau de Doutor
em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa
de Oliveira.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira (ICEN – UFPA - Orientador)

Prof. Dr. André Salim Khayat – Membro Interno (ICB-UFPA)

Profa. Dra. Barbara do Nascimento Borges – Membro Externo (ICB-UFPA)

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes – Membro Externo (ICB-UFPA)

Profa. Dra. Carolina de Fátima Aquino Moreira Nunes – Membro Externo (ICB-UFCE)

Dra. Fernanda do Espirito Santo Sagica – Membro Suplente (SAMAM-IEC)

AGRADECIMENTOS

À minha família, esposa e amigos que sempre estiveram juntos nesta caminhada desde o início de minha empreitada acadêmica. Ao meu orientador, Prof PhD Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira que aceitou esta empreitada, apostando em mim mesmo ainda acadêmico de medicina.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e pela oportunidade de fazer parte do Programa MD-PhD que me proporcionou a oportunidade única de poder continuar nesta paixão que sempre a pesquisa acadêmica e desenvolver minhas habilidades em caminhos que jamais pensei trilhar.

Agradecimento especial em forma de poema à minha avó. Mulher, ribeirinha, marajoara, única. Seu único sonho sempre foi dar educação aos seus filhos. Nesse sonhou propiciou tudo que somos hoje. Obrigado Dona Maria.

Mariá

Mulher, marajoara, cabocla, Mariá
Lá pelos 30 nasceu,
Lá pelos 20 casou,
Lá pelas tantas cresceu, Mariá

Pelo tajapuru com sua dança,
Iniciou sua família e sua andança,
Entre festas sua paixão,
A felicidade sua missão,
Ah Mariá, só queria pros seus filhos estudá,

De seu rio subiu,
Em breves ficou,
De tantos filhos e tantos problemas
Sempre um sorriso brotou,
Sempre uma alegria passou,
Sempre uma felicidade deixou!
Ah Mariá só queria pros seus filhos estudá!

Mulher, marajoara, cabocla, Mariá
Uma decisão em sua vida,
Uma mudança de perspectiva,
Uma saída do dia-a-dia,
Ah Mariá só queria pros seus filhos estudá!

Transformou sua querença,
Em uma forte persistência,
Hoje diz para todos sem remorso e
Com os olhos lagrimejosos,

Sem perceber todo seu feito
Enche de orgulho no peito
Entoa sua voz marejada
Pensando em poucas palavras
Diz:

Ah meu filho eu só queria que meus filhos estudassem!

Ah Mariá!

Jonathan S. Sarraf em gratidão ao seu sonho. Estamos conseguindo.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o tipo de neoplasia maligna que se desenvolve no cólon, reto e canal anal. No Brasil, é a segunda maior causa de óbitos da população e é tido como problema de saúde pública devido o envelhecimento populacional. A porcentagem de doença localizada ao diagnóstico é de 39% e de doença metastática é de 13.9%. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas de RNA transcritas de regiões não codificantes do genoma, portanto, não possuem estrutura de leitura aberta e não são traduzidas em proteínas. Podem ser usados como biomarcadores diagnóstico, preditivos ou prognósticos para o tratamento do CCR e de outros cânceres. Dentre os ncRNAs, os miRNAs apresentam-se cada dia mais com estudos evidenciando sua importância do acompanhamento e entendimento do seu impacto para o acompanhamento do paciente com CCR. Dessa forma, entender suas relações com genes específicos que já são utilizados para determinar tratamentos para este câncer, como o gene KRAS, bem como com outros genes potencialmente importantes para a carcinogênese e evolução natural da doença, torna-se de extrema importância. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o impacto da expressão diferencial de miRNAs e de SNPs no prognóstico de pacientes com câncer colorretal utilizando abordagens integrativas de bases de dados e dados primários de pacientes da região norte do Brasil, além de potenciais impactos na via de sinalização do gene KRAS, por meio de técnicas de bioinformática.

Palavras-chave: Câncer colorretal; mirRNA; KRAS; SNP

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the type of malignant neoplasm that develops in the colon, rectum and anal canal. In Brazil, it is the second leading cause of death in the population and is considered a public health problem due to population aging. The percentage of localized disease at diagnosis is 39% and of metastatic disease is 13.9%. Non-coding RNAs (ncRNAs) are RNA molecules transcribed from non-coding regions of the genome, therefore, they do not have an open reading frame and are not translated into proteins. They can be used as diagnostic, predictive or prognostic biomarkers for the treatment of RCC and other cancers. Among the ncRNAs, the miRNAs are increasingly presented with studies showing their importance in monitoring and understanding their impact for the follow-up of patients with CRC. Thus, understanding their relationships with specific genes that are already used to determine treatments for this cancer, such as the KRAS gene, as well as with other genes potentially important for carcinogenesis and the natural evolution of the disease, becomes extremely important. Thus, this work aims to evaluate the impact of the differential expression of miRNAs and SNPs on the prognosis of patients with colorectal cancer using integrative approaches to databases and primary data from patients in the northern region of Brazil, as well as potential impacts on the pathway of KRAS gene signaling, through bioinformatics techniques.

Key words: Colorectal câncer; miRNA; KRAS; SNPs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Genes envolvidos nas vias de sinalização e carcinogênese do câncer colorretal....	35
Figura 2 – Fluxograma geral de avaliação dos processos de análise.....	36
Figura 3 – Fluxograma de análise e validação dos SNPs analisados Erro! Indicador não definido.	
Figura 4 – Fluxograma da análise integrativa entre bases de dados dos SNPs obtidos	37
Figura 5 – Workflow do protocolo de avaliação para predição de alvo genético dos miRNA	39
Figura 6 – Processo de desenvolvimento da pesquisa de acordo com diretrizes PRISMA.....	69
Figura 7 – Distribuição dos estudos por continente	70
Figura 8 – Avaliação da expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon – TCGA COAD.....	86
Figura 9 – Avaliação da expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon – TCGA READ	87
Figura 10 – Avaliação da expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon – TCGA COAD – ENCODE.....	88
Figura 11 – Avaliação de rede de interação do gene KRAS com genes associados à carcinogênese do CCR.....	89
Figura 12 – network analysis de miRNAs selecionados para validação	91
Figura 13 – Avaliação da expressão de miRNA lados direito e esquerdo em relação aos dados do encode.....	98
Figura 14 – Avaliação da expressão diferencial de mirRNA entre os cólons direito e esquerda	99
Figura 15 – Avaliação da relação do gene FOXK1 com os miRNAs avaliados	102
Figura 16 – Avaliação da relação dos miRNAs com os genes ZEB1 e VEGFA	103
Figura 17 – Fluxo de obtenção de dados a partir das amostras teciduais coletadas	109
Figura 18 – Fluxo de validação das relações dos SNPs avaliados em conjunto com as bases de dados disponíveis no NCBI	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tipos de ncRNA e suas funções	27
Quadro 2 – Bases de dados sobre ncRNA	28
Quadro 3 – Genes e miRNA Relacionados	89
Quadro 4 – Genes e miRNA Relacionados	90
Quadro 5 – Genes e miRNA Relacionados	91
Quadro 6 – MiRNAs diferencialmente expressos segundo clusters formados	99
Quadro 7 – MiRNAs diferencialmente expressos segundo clusters formados	100

LISTA DE TABELAS

Table 1 – ncRNAs and their functions	44
Table 2 – Databases of ncRNA data.....	45
Tabela 3 – Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações.....	71
Tabela 4 – Avaliação das características clínicas pacientes CTGA	85
Tabela 5 – número de miRNAs com significância.....	86
Tabela 6 – número de miRNAs com significância.....	87
Tabela 7 – número de miRNAs com significância.....	87
Tabela 8 – Descrição dos status dos SNP avaliados nas amostras	110
Tabela 9 – Descrição dos SNPs que apresentaram alteração em todas as amostras e genes aos quais eles se relacionam	111

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
ACVR1	Receptor 1 da Activina
circRNA	<i>Circular RNA</i>
CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno carcinoembrionico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	<i>Confidence interval</i>
CMS	<i>Consensus Molecular Subtypes</i>
CRCSC	<i>Colorrectal Cancer Subtype Consortium</i>
ECR	Ensaio Clínico Randomizado
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GNEF	Fator de troca de nucleotídeos de guanina
GWAS Catalog	<i>Genome Wide Association Studies Catalog</i>
HBEGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LV	leucovorin
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	microRNA
ncRNA	RNA não codificante
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NHGRI	<i>National Human Genome Institute</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Protocol</i>
RALGDS	Estimulador de dissociação de nucleotídeos de guanina Ral
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sncRNA	<i>small non-coding RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
TCGA	<i>Cancer Genome Atlas Project</i>
TCGA-COAD	<i>Genome Atlas Colon Adenocarcinoma</i>
TCGA-READ	<i>Cancer Genome Atlas Rectum Adenocarcinoma</i>
TNM	<i>Classification of Malignant Tumours</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial-growth fator A</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer.....	16
1.2 Epidemiologia	16
1.3 Câncer de cólon e reto	17
1.3.1 Transformação neoplásica	18
1.3.2 Epidemiologia.....	19
1.3.3 Fatores de Risco.....	20
1.3.4 Estadiamento.....	21
1.3.2.1 Estádio I.....	22
1.3.2.2 Estádio II	Erro! Indicador não definido.
1.3.2.3 Estádio III.....	Erro! Indicador não definido.
1.3.2.4 Estádio IV	23
1.3.5 Tratamentos.....	23
1.3.6 Biologia Molecular e Classificação Molecular.....	23
1.3.7 Gene <i>KRAS</i> e Câncer Colorretal	24
1.3.8 Biomarcador preditivo	26
1.4 RNAs não codificantes	26
1.5 Bases de dados.....	29
1.5.1 TCGA	30
1.5.2 ENCODE	30
1.5.3 GWAS.....	30
1.5.4 STRING	31
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MÉTODO	33
3.1 Aspectos éticos	33
3.2 Revisão sistemática	33
3.3 Amostras de tecidos tumorais dos pacientes	33
3.3.1 Tecidos tumorais frescos	33
3.3.2 Tecidos tumorais parafinados	34
3.4 Extração e quantificação do DNA dos tecidos tumorais e adjacentes utilizados.....	34

3.5 Hibridização genômica comparativa em arrays (aCGH) para análises de Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNPs).....	34
3.6 Avaliação dos SNPs	35
3.7 Análise de expressão diferencial de miRNAs	37
3.8 Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Capítulos 1 - Noncoding rnas and colorectal cancer: a general overview.....	42
4.2 Capítulo 2 - Associação da expressão de miRNA e prognóstico em pacientes com câncer colorretal: uma revisão sistemática	60
4.3 Capítulo 3 - Avaliação da expressão de mirnas e relação com a via de sinalização do gene kras e sp1 em pacientes com câncer colorretal: avaliação integrativa de bases de dados 82	
4.4. Capítulo 4 – Os dois lados do mesmo Cólon- O cólon de pessoas normais é diferente? Uma avaliação integrativa de base de dados	95
4.5 Capítulo 05 - Avaliação do impacto de snps nas vias dos genes HBEFG e TRFC em pacientes com câncer colorretal estágio inicial em centro de pesquisa na região amazônica brasileira - análise integrativa de bases de dados e técnicas de bioinformática.....	107
REFERÊNCIAS GERAIS	114
ANEXOS	133
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DA FMABC	134
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DA UNAMA	139

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer tem em sua gênese no crescimento desordenado de células e capacidade de invadir órgãos e tecidos vizinhos (INCA, 2023). Possui origem multifatorial, influenciada por fatores ambientais, comportamentais, étnicos e GENÉTICOS (OLIVEIRA E FORTES, 2013; WU *et al.*, 2018).

O aumento da expectativa de vida em consonância com as mudanças de estilo de vida e exposição cada vez maior à fatores cancerígenos abrem um alerta importante para o aumento do número de casos, e assim o câncer tem ganhado cada vez mais importância no perfil de adoecimento da população brasileiro (RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014; INCA, 2023). No Brasil, é a segunda maior causa de óbitos da população e é tido como problema de saúde pública devido o envelhecimento populacional. São estimados, para o triênio de 2023-2025, mais de 704 mil novos casos dessa doença no país, sendo pouco mais de 25.460 mil casos estimados para a região Norte do país em 2023 (INCA, 2023).

Quando avaliamos a gênese do câncer, existem basicamente dois tipos distintos de alterações envolvidas nesse processo: a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (Cooper, 2000; PIAZZA *et al.*, 2010). Os oncogenes se originam de mutações ocorridas nos proto-oncogenes, que estão ligados normalmente ao processo de crescimento e proliferação celular (PIAZZA *et al.*, 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Quando estes genes sofrem mutações, ocorrem desregulações no processo de crescimento celular, podendo levar a proliferação desordenada e invasão de outros tecidos (COOPER, 2000; PIAZZA *et al.*, 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os genes supressores de tumor são genes envolvidos em processos ou mecanismos de controle do ciclo celular ou do crescimento celular (PIAZZA *et al.*, 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Quando modificados, podem perder sua função na regulação negativa da proliferação celular, podendo levar ao crescimento desordenado das células (PIAZZA *et al.*, 2010).

1.2 Epidemiologia

O câncer é uma doença global, configurando-se como problema de saúde pública nos mais diversos países do mundo. Na maioria deles, essa doença já se encontra entre as principais

causas de morte antes dos 70 anos de idade. Segundo estimado pelo GLOBOCAN 2018, foram esperados para este ano um total de 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo e 9,6 milhões mortes decorrentes dessa doença (BRAY *et al.*, 2018). Espera-se que, ao longo do século XXI, o câncer se torne a principal causa de morte no mundo e a barreira mais importante para frear a expectativa de vida da população (BRAY *et al.*, 2018).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), são estimados para o triênio de 2023-2025 cerca de 704 mil novos casos de câncer para cada ano. Quando esses dados são ajustados para considerar o sub-registro existente no país, estima-se um total de 685 mil novos casos a cada ano (INCA, 2023). Dentre os sítios tumorais, o câncer de pele não-melanoma é o mais incidente (220 mil casos), seguido dos cânceres de mama (74 mil) e próstata (72 mil casos), colorretal (46 mil casos), pulmão (32 mil casos) e estômago (21 mil casos).

Assim como a variação existente entre os países do mundo, as regiões do Brasil também têm taxas de incidência diferentes entre si, bem como diferentes magnitudes para cada tipo de câncer. Estima-se que a Região Sudeste concentre as maiores taxas de incidência do país, com cerca de 70% dos novos casos de câncer, seguida das regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%). Quanto aos tipos de câncer, nas regiões Sul e Sudeste predominam os de próstata e mama feminina, além de pulmão e intestino. Já no Norte e Nordeste, há um grande impacto dos cânceres de colo do útero e de estômago nas taxas de incidência, mesmo que também apresentem o de próstata e mama feminina como principais (INCA, 2023).

1.3 Câncer de cólon e reto

O câncer colorretal (CCR) é o tipo de neoplasia maligna que se desenvolve no cólon, reto e canal anal (EISENHARDT, 2013; ROSAS *et al.*, 2013). Seu início ocorre geralmente na forma de um pólipos benigno com potencial cancerígeno, como os pólipos adenomatosos, observados em 96% dos casos (SIEGEM *et al.*, 2014); SLATTERY *et al.*, 2016).

Assim como nos outros cânceres, o sedentarismo, tabagismo e consumo excessivo de álcool, aumentam a taxa de incidência do CCR (EISENHARDT, 2013). A idade avançada também eleva o risco de desenvolvimento desta neoplasia, sendo que 90% dos novos casos ocorrem em indivíduos maiores que 50 anos (EISENHARDT, 2013). Outros fatores que também pode influenciar são: sexo, sendo mais prevalente em homens; etnia, obesidade, contato com substâncias cancerígenas e alimentação rica em carnes vermelhas, gorduras, componentes nitrosos, aminas heterocíclicas, e pobres em cálcio (EISENHARDT, 2013; ROSAS *et al.*, 2013; SIEGEL *et al.*, 2014)

1.3.1 Transformação neoplásica

A gênese do câncer colorretal se dá através da mudança do epitélio normal para um tecido de caráter hiperproliferativo. A partir de então, ocorrerá a perda da homeostase pelo desequilíbrio estrutural do tecido, o que poderá culminar em adenomas no futuro. Esse processo é heterogêneo, tendo influência de aspectos que também irão definir a evolução da doença (LUCAS *et al.*, 2017).

Na etiopatogenia do câncer colorretal estão envolvidas questões genéticas e ambientais, bem como a interação entre elas. Mutações genéticas podem estar envolvidas com oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA. De acordo com sua origem, a tumoração poderá ser classificada como esporádica, hereditária ou familiar (MARMOL *et al.*, 2017).

Neoplasias provindas de mutações pontuais representam a maior parte dos casos (70%) e desenvolvem-se de forma mais longa. Na maior parte dos casos costuma ocorrer um padrão de mutações denominado transformação adenoma-adenocarcinoma. O processo tem início em genes supressores de tumor, o que culmina na formação de pólipos – lesões não malignas. Em 10 anos, aproximadamente 15% dessas formações evoluirão para carcinomas se não forem devidamente ressecadas. Tal processo costuma envolver mutações nos genes *KRAS*, *P53* e *APC* (MÁRMOL *et al.*, 2017).

Ademais, discute-se também a relação entre ocorrência de câncer colorretal e a microbiota intestinal. A neoplasia costuma ocorrer com maior frequência em regiões com maior densidade bacteriana. Recentemente, estudos têm demonstrado a modificação dessa microbiota em pacientes com câncer colorretal quando comparados a população sem a patologia. Pesquisas em modelos animais endossam essa linha ao comprovar que animais com microbiota intestinal normal têm maior desenvolvimento de câncer quando comparados aqueles desprovidos de tal microbiota. Foram apontados como aspectos relacionados e determinantes questões como a liberação de toxinas específicas e a ruptura da barreira epitelial, os quais levam a inflamação (LUCAS *et al.*, 2017).

1.3.2 Epidemiologia

De acordo com o GLOBOCAN 2018, o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo (18,4%), seguido do câncer colorretal (9,2%), câncer de estômago (8,2%) e câncer de fígado (8,2%). Quanto à incidência por sexo, em homens o câncer colorretal ocupa o segundo lugar entre as neoplasias mais frequentemente diagnosticadas, atrás somente da neoplasia maligna de pulmão. Por sua vez, entre pessoas do sexo feminino, o câncer de colón e reto segue o câncer de mama entre os canceres mais incidentes (BRAY *et al.*, 2018).

Em 2018, foi estimado que ocorreriam mais de 1,8 milhões de novos casos de câncer colorretal no mundo, além dessa patologia em específico ter estado relacionada a 1 em cada 10 casos de morte por câncer a nível global. Apesar de mais comum em países desenvolvidos, costuma ser mais letal nos países em desenvolvimento, o que acaba equiparando as taxas de mortalidade. Quanto à incidência por continente, as maiores taxas estão presentes na Europa, seguida por Oceania e América do Norte – países como a Noruega tem o câncer colorretal como o mais incidente em ambos os sexos de sua população. Em países onde ocorre um momento de transição socioeconômica, as taxas de incidência aumentam proporcionalmente ao IDH. Assim, a doença pode ser considerada um marcador de desenvolvimento socioeconômico mundial (BRAY *et al.*, 2018).

Ainda de acordo com o Global Cancer Observatory (2018), as regiões com maior incidência de câncer colorretal no mundo nos próximos anos serão a Austrália e Nova Zelândia, seguidas pelos países do continente europeu e América do Norte, todos com taxas acima da média mundial. A primeira região em incidência abaixo da média global é a América do Sul. Por fim, os mesmos países lideram as previsões de mortalidade, no entanto, liderados pela Europa no que diz respeito a este parâmetro.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer, são estimados para cada ano entre 2023-2025, mais de 45.630 casos de câncer colorretal, sendo a incidência ligeiramente maior entre pessoas do sexo masculino. Tais predileções representam 20,78 novos casos a cada 100 mil homens 21,41 para cada 100 mil mulheres. Quanto a mortalidade, foram registrados em 2017, no Brasil, mais de 18.000 mortes por câncer colorretal, sendo 9.207 óbitos (9,12/100 mil habitantes) em homens e 9.660 (9,33/100 mil habitantes) em mulheres.

Em uma análise regional, essa neoplasia é mais incidente nas regiões Sudeste (28,62/100 mil habitantes), seguindo-se as regiões Sul (26,89/100 mil habitantes), Centro-Oeste (17,25/100 mil habitantes) , Nordeste (10,99/100 mil habitantes) e Norte (7,78/100 mil habitantes), respectivamente. Quanto à distribuição por estado da federação, as estimativas para 2023

destacam os estados de São Paulo (14.980), Rio de Janeiro (7.930), Minas Gerais (4.630), Bahia (1.940), Goiás (1.110) e Ceará (1.210) como aqueles onde haverá o maior número de novos casos. O Pará aparece com a estimativa de 640 novos casos no mesmo ano (INCA, 2023).

Por sua vez, quando se trata da análise por sexo, o câncer colorretal é a segunda neoplasia maligna mais frequente em mulheres nas regiões Sudeste (26,18/100 mil) e Sul (23,65/100 mil). Já em uma análise pelo território nacional, o câncer colorretal é a quarta neoplasia maligna mais incidente em homens e a terceira em mulheres, estando atrás dos cânceres de próstata, estômago e pulmão em homens e mama e colo do útero em mulheres (INCA, 2023).

1.3.3 Fatores de risco

Atualmente, é possível mostrar uma relação direta entre dieta, estilo de vida e risco de desenvolvimento de câncer (RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014). Estima-se que cerca de 40% dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer estão associados à dieta (RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014). A variação da incidência de câncer entre países aparenta ter uma forte associação com diferentes hábitos alimentares. É possível sugerir que uma dieta ocidental, rica em gorduras e proteínas, aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de cólon e reto (LIU *et al.*, 2014). Alguns alimentos estão relacionados diretamente ao desenvolvimento de neoplasia de cólon e reto, dentre eles a carne vermelha e carne processada (SANDHU *et al.*, 2001; RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014). Em contrapartida, é possível verificar os efeitos positivos da ingestão de uma dieta baseada em frutas, vegetais, cereais, legumes e carne branca, tipicamente mediterrânea, mostrando diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014).

O mecanismo provável para esta associação, entre o consumo de carne e a carcinogênese colorretal, consiste no aumento da quantidade de ingestão de gordura contida na carne, causando um aumento da resistência à insulina, bem como na produção de ácidos biliares secundários, o que facilita a carcinogênese. Além disso, metabólitos advindos do consumo da carne como amino-aromáticos heterocíclicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos nitrosos e grupo Heme-Fe são considerados genotóxicos, modificando diretamente o DNA, a partir de seus metabólitos reativos (SANDHU *et al.*, 2001)

Assim como a dieta, outros fatores como obesidade, síndrome metabólica e o sedentarismo contribuem como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de cólon e reto (RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014). A obesidade está também relacionada com a

hiperinsulinemia crônica que leva ao aumento da biodisponibilidade de IGF-1, além de possibilitar variações no microambiente celular pela presença de fatores de inflamação, contribuindo assim, para um mau prognóstico no desenvolvimento do câncer (RUIZ e HERNÁNDEZ, 2014).

1.3.4 Estadiamento

O estadiamento é o método para classificação e padronização dos cânceres. É específico para cada tipo de patologia e leva em consideração, em sua maioria, extensão do tumor, presença de linfonodos comprometidos e desenvolvimento de metástases (INCA, 2018; PIÑEROS *et al.*, 2019).

A classificação TNM é a mais utilizada mundialmente e aceita pelas maiores sociedades de cancerologia do mundo, sendo que esta pode direcionar o tratamento para patologias distintas, bem como ser avaliada como fator prognóstico importante para o desenvolvimento do paciente (PIÑEROS *et al.*, 2019). O estadiamento clínico normalmente varia de I-IV a depender do nível de desenvolvimento da doença, sendo I mais inicial e IV normalmente doença mais avançada (PIÑEROS *et al.*, 2019).

Um dos pilares para o planejamento do tratamento de cada paciente, o estadiamento do câncer deixou de ser apenas fator relacionado a antecipação de prognóstico. O sistema TNM é o padrão internacional para classificação de cânceres, sendo funcional para estimativa de prognóstico, resposta clínica a terapêutica estabelecida, além do delineamento da mesma (NAGTEGAAL *et al.*, 2017).

Apesar de se reconhecer o sistema TNM como a melhor opção para o estadiamento do câncer colorretal, são apontadas constantemente lacunas na sua configuração. Em edições mais recentes foram inclusos os parâmetros como os depósitos tumorais no estadiamento nodal, no entanto, outros pontos importantes, como a invasão vascular extramural, continuam ausentes (NAGTEGAAL *et al.*, 2017).

Quanto ao estadiamento pré-operatório, o objetivo principal é a confirmação da extensão do acometimento tumoral, seja a nível local ou a distância. Nesse momento, pode-se lançar mão de ferramentas como a dosagem do antígeno carcinoembrionário (CEA), mas principalmente, dos exames de imagem associados à avaliação clínica do indivíduo. A rotina de exames solicitados costuma incluir dosagem de CEA, tomografia computadorizada de abdome, pelve e tórax, além da colonoscopia. No estadiamento clínico, destacam-se a

tomografia computadorizada, além de ressonância magnética e ultrassonografia transretal na busca por metástases (SOUZA *et al.*, 2018).

Quanto aos exames de imagem, no estadiamento do câncer de cólon, indica-se primordialmente a tomografia computadorizada com contraste, que permite identificar a localização da lesão, bem como sua relação com estruturas adjacentes. Uma limitação a ser apontada nesses casos é a dificuldade em diferenciar as camadas mucosa e submucosa, o que impede a diferenciação entre tumores estágio T1 e T2 (SOUZA *et al.*, 2018; KARAMCHANDANI *et al.*, 2019).

Já para o estadiamento do câncer de reto, a ressonância magnética é o exame de imagem de escolha. Aqui já é possível a diferenciação entre as camadas da parede. Os tumores podem variar entre aspecto polipoide, ulcerativo, semi-circunferencial e circunferencial (SOUZA *et al.*, 2018).

1.3.4.1 Estádio I

No estágio I, o tumor encontra-se ainda restrito à parede colônica, camadas mucosa e muscular. A intervenção de escolha dependerá da extensão do carcinoma para além, ou não, do pólip. O objetivo deve ser a ressecção da lesão com margens livres. Com a extração do pólip por colonoscopia, caso as margens estejam livres de células neoplásicas, não são necessárias intervenções adicionais (DE ROSA *et al.*, 2015). No entanto, se faz necessária cirurgia complementar nos casos de margens não livres. O tipo de procedimento indicado dependerá da área acometida pela neoplasia.

1.3.4.2 Estádio II

Nesse estágio, o tumor acomete estruturas além da camada muscular da parede colônica, mas ainda poupa o sistema linfático. Assim, recomenda-se a colectomia parcial considerando as vias de disseminação tumoral para definição da abrangência da ressecção. Questões como o estágio, metástases, possibilidade de linfadenectomia restrita, complicações, entre outras, irão guiar a decisão terapêutica de associar terapia adjuvante ou não para esses pacientes (BLOCK *et al.*, 2018).

1.3.4.3 Estádio III

No estágio III são encontradas metástases em linfonodos regionais. A colectomia parcial, com ressecção a definir dependendo do local da lesão, associada a terapia adjuvante é padrão de escolha. Atualmente, tem sido utilizada em maior escala a associação oxaliplatina (5-FU + oxaliplatina + folinato de cálcio) ou irinotecano (5-FU + irinotecano + folinato de cálcio) na terapia adjuvante (BLOCK *et al.*, 2018).

1.3.4.5 Estádio IV

Por fim, no estágio IV, há o acometimento de outros órgãos, metástases a distância. Para esses, além da indicação cirúrgica e de terapia adjuvante, também se encaixa a indicação de terapia neoadjuvante. Em muitos casos o procedimento cirúrgico precisa ser realizado para conter complicações somente, sem perspectiva de real impacto na cura. O tratamento quimioterápico passa a ser o protagonista para o controle da evolução da doença (SUGIHARA, 2017).

1.3.5 Tratamentos

O tratamento do câncer colorretal tem evoluído exponencialmente nos últimos 20 anos, com avanços consideráveis principalmente no que tange as terapias adjuvantes e neoadjuvantes. Devido a esse aumento das possibilidades de tratamento, é cada vez mais necessário fazer a correta classificação do estágio tumoral já que esse dado irá conduzir as decisões terapêuticas iniciais (KUIPERS *et al.*, 2015; NAGTEGAAL *et al.*, 2017; BLOCK *et al.*, 2018).

1.3.6 Biologia Molecular e Classificação Molecular

A porcentagem de doença localizada ao diagnóstico é de 39% e de doença metastática é de 13.9% segundo Classification of Malignant Tumours (TNM) (BRIERLEY, 2017). Atualmente, outras classificações começam a ser utilizadas para este tipo de câncer, tendo como base critérios genéticos e moleculares (CANCER GENOME ATLAS, 2012; GUINNEY *et al.*, 2015). Essas novas classificações distinguem o CRC em CMS1-hipermutado, microsatélite instável e forte ativação imunológica; CMS2 - ativação de sinalização epitelial, marcador WNT

e MYC; CMS3 - desregulação epitelial e metabólica evidente; e CMS4 proeminente ativação do fator de crescimento transformador, invasão estromal e angiogênese (GUINNEY *et al.*, 2015).

Além disso, outras avaliações baseadas principalmente em alterações no DNA, outros fatores moleculares como metilações, expressão de miRNAs e outras alterações epigenéticas e pós transcricionais vêm sendo estudadas, na tentativa de avaliar novos biomarcadores que possam prever prognósticos ou diferentes desfechos nesta doença (THOMAS *et al.*, 2015; LAM *et al.*, 2016). Os biomarcadores são utilizados na avaliação de características relacionadas ao tumor e a condição clínica de cada paciente (ERSTAD *et al.*, 2015; STINTZING *et al.*, 2015). Estas podem prever diferentes prognósticos e determinar diferentes respostas a tratamentos (QU *et al.*, 2011; FERLAY, 2013; STINTZING *et al.*, 2015). Dentro desta abordagem, podem ser estabelecidos marcadores prognósticos, aqueles que determinam diferentes prognósticos com impactos na sobrevida global e sobrevida livre de doença como, por exemplo, fatores ligados ao tumor (Proliferação celular; Invasão tecidual; Movimento celular; Angiogênese) e aos pacientes (Reações adversas - toxicidade; Resistência a drogas; Resposta a drogas; Estágio TNM [Metástase, metástase de linfonodo e tamanho do tumor]; Localização do tumor). Além disso, pode apresentar-se como marcadores preditivos que podem determinar qual a medicação mais indicada para o tratamento, a depender de sua avaliação (FERLAY, 2013; STINTZING *et al.*, 2015). Os miRNAs podem se comportar tanto como fatores prognósticos, como fatores preditivos.

1.3.7 Gene *KRAS* e Câncer Colorretal

O *KRAS* é um proto-oncogene, localizado no cromossomo 12, composto por quatro éxons codificantes e um não codificante. Codifica proteínas da superfamília de pequenas GTPases, com 21kDa e compostas por 188 ou 189 aminoácidos (Wan *et al.*, 2019). Esse gene faz parte de uma família, a dos genes *ras*, composta também por outros dois genes, *HRAS* e *NRAS*, que codificam proteínas semelhantes. A porção N-terminal desses três genes compreendem um domínio G altamente conservado, gerando uma estrutura comum a todas elas. Já na extremidade C-terminal, as proteínas divergem substancialmente, sendo conhecida como região hipervariável (SCHUBBERT *et al.*, 2007).

A proteína *KRAS* existe em duas formas homólogas, *KRAS4A* e *KRAS4B*, como resultado de um splicing alternativo no terminal C do gene *KRAS*. Entre elas, a principal é a *KRAS4B*, que apresenta maior estabilidade. Logo, a proteína *KRAS4A* é considerada

secundária, exibindo uma discreta atividade transformante. Porém, quando há mutação no gene, ela se expressa simultaneamente em ambas as isoformas (BOQUETT e FERREIRA, 2010).

As proteínas da família *ras*, no geral, apresentam associação estável com a membrana plasmática, dependente de uma modificação lipídica na porção C-terminal. A proteína KRAS4A, assim como as proteínas HRAS e NRAS, recebe a adição de um grupo palmitato aos resíduos de cisteína na porção C-terminal, modificação essencial à sua atividade. Já a proteína KRAS4B não apresenta a mesma adição, que aparentemente é substituída por um alongamento de resíduos de lisina (BOQUETT e FERREIRA, 2010).

As proteínas KRAS normais, assim como as demais da família *ras*, agem trafegando pelo citoplasma, tendo papel na transdução de sinal do meio extracelular, controlando vias de sinalização reguladoras da proliferação celular normal, atuando como “interruptores moleculares” em uma grande rede de vias de sinalização, e participam de processos neuronais como aprendizado, plasticidade sináptica e memória (BOQUETT e FERREIRA, 2010).

As proteínas *ras* são GTPases com grande atividade enzimática, que se apresentam em baixa quantidade nas células normais do organismo humano, possuindo características cinéticas semelhantes às da subunidade alfa da proteína G. Essas proteínas exibem dois estados: ativas, quando ligadas à GTP; inativas, quando ligadas à GDP. Essa mudança de estado ocorre por ação celular intrínseca, e apenas a forma ativa é capaz de mediar a resposta à proliferação celular (BOQUETT e FERREIRA, 2010).

Essas proteínas têm papel de regular a resposta celular a diversos estímulos extracelulares, incluindo fatores de crescimento. A ligação do fator de crescimento aos receptores da superfície celular cria locais de acoplamento intracelular para moléculas adaptadoras e proteínas de transmissão de sinal, que recrutam e ativam fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GNEFs), como membros da família SOS. Os GNEFs deslocam os nucleotídeos de guanina do Ras e permitem a ligação passiva ao GTP, que é abundante no citosol. O Ras ligado ao GTP pode interagir produtivamente com mais de 20 efetores, incluindo Raf, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e estimulador de dissociação de nucleotídeos de guanina Ral (RALGDS), para regular várias respostas celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação (SCHUBBERT *et al.*, 2007). A presença de mutação de aminoácidos no gene KRAS prejudica a atividade da GTPase hidrolase, resultando em um estado ligado ao GTP constitutivamente ativo, com a consequente ativação contínua de vias de sinalização pró-proliferativas, mesmo na ausência de estímulo extracelular (WAN *et al.*, 2019).

1.3.8 Biomarcador preditivo

Com a evolução do conhecimento sobre a genética e os eventos moleculares por trás do câncer, o uso de agentes alvo na terapia oncológica tem crescido, o que inclui o câncer colorretal (CCR). São diversos os biomarcadores estudados como preditores de resposta à terapia. Entre eles, podem-se citar instabilidade de microssatélites, perda de heterozigose de 18q, EGFR e ativação mutacional dos oncogenes RAS. Dentre esses últimos, o gene KRAS tem se apresentado como um dos mais importantes no CCR (FAKIH, 2010).

A mutação do gene KRAS tem estreita relação com a formação de um subconjunto de tumores de cólon, ocorrendo precocemente na sequência adenoma-carcinoma. Estima-se que essa mutação esteja presente em 9% dos adenomas <1cm, em 58% dos adenomas >1cm e em 30 a 50% dos cânceres colorretais metastáticos. As mutações envolvem, principalmente, os códons 12 e 13 do gene KRAS (FAKIH, 2010).

As proteínas codificadas pelo gene KRAS se configuram como componentes essenciais na cascata de sinalização do EGFR. Por isso, quando mutado, esse gene acaba causando a inefetividade dos agentes farmacológicos que agem na inibição do EGFR. Diversos estudos já demonstraram que a combinação de cetuximabe (agente farmacológico anti-EGFR) com os esquemas de primeira linha FOLFOX (oxaliplatina + 5-fluorouracil [5-FU] infusional /leucovorin [LV]) ou FOLFIRI (irinotecano + 5-FU/LV infusional) no câncer colorretal metastático mostra resultados clínicos de melhora apenas em pacientes com tipo selvagem (não mutado) do gene. Por isso, a presença de mutação no KRAS é considerada um forte preditor de eficácia dos agentes anti-EGFR (LIEVRE *et al.*, 2006; FAKIH, 2010).

Diante disso, atualmente, recomenda-se fortemente que os serviços oncológicos realizem a pesquisa de mutação no gene KRAS para pacientes com câncer colorretal metastático. Como resultado, prevê-se uma otimização dos efeitos terapêuticos, diminuição da toxicidade do tratamento e redução de custos (LIEVRE *et al.*, 2006; FAKIH, 2010).

1.4 RNAs não codificantes

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas de RNA transcritas de regiões não codificantes do genoma, portanto, não possuem estrutura de leitura aberta e não são traduzidas em proteínas (Marmol *et al.*, 2017). Os ncRNAs são divididos principalmente em duas categorias com base em seu comprimento, utilizando como ponto de corte o comprimento de 200 nucleotídeos. Os ncRNAs com menos 200 nucleotídeos são referidos como sncRNAs

(*small non-coding RNAs*) e incluem miRNA (*microRNA*), siRNA (*small interfering RNA*), piRNA (*piwi-interacting RNA*) e snoRNA (*small nucleolar RNA*). Os ncRNAs com mais de 200 nucleotídeos constituem uma classe individual de ncRNAs conhecidos como lncRNA (*long non-coding RNA*) (HOMBACH e KRETZ, 2016; LIN e HE, 2017; DIAMANTOPOULOS *et al.*, 2018). Os ncRNAs podem ser modificados por várias alterações genéticas e epigenéticas herdadas, além de variações estruturais e transcricionais. Todos esses fatores contribuem para sua desregulação e estão implicados na etiologia, na fisiopatologia e até no prognóstico do câncer (MARMOL *et al.*, 2017).

Os ncRNAs podem atuar como oncogenes ou como genes supressores de tumores no CCR e são potenciais biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico, com possíveis implicações clínica (ZHANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019).

A descoberta dos ncRNA foi de suma importância para o entendimento de que o conhecimento apenas das sequências simples de DNA e de nossos genes são insuficientes para a compreensão global de todos os processos que gerem a regulação genética. Cada ncRNA pode regular processos diferentes e apresentar funções diversas (Quadro 1). Estas funções vão desde o silenciamento de complexos no RNA mensageiro (mRNA), até inibição competitiva de alvos de mRNAs, regulação de mecanismos de splicing, entre outros (KROL *et al.*, 2010; YATES *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2015; CARTER *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019). Atualmente, diante de todo o volume de dados gerados por métodos de ampla avaliação, dentre eles microarray, sequenciamento de nova geração entre outros, é possível utilizar de bases de dados para pesquisa de sequências, anotação, predição de alvos e vários outros processos para o estudo dos ncRNAs (Quadro 2).

Quadro 1 – Tipos de ncRNA e suas funções

Tipo	Função	Referências
miRNA	- Silenciamento de genes, afetando o crescimento e a proliferação celular.	(Yates <i>et al.</i> , 2013; Carter <i>et al.</i> , 2017)
siRNA	- Silenciamento de genes por meio da participação no complexo de RNA interference.	(Schütze, 2004; Bakhtiyari <i>et al.</i> , 2013; Nikam e Gore, 2018; Singh <i>et al.</i> , 2018)
piRNA	- Promove rearranjo do genoma na espermiogênese, regulação epigenética do DNA, regulação de proteínas e silenciamento de transposons.	(Zharikova e Mironov, 2016; Chalbatani <i>et al.</i> , 2018; Liu <i>et al.</i> , 2019)
snoRNA	- Modificações bioquímicas de outros RNAs, precursores do miRNA, splicing e atividade da telomerase.	(Xing e Chen, 2018)

	- Participam na modificação de pequenos RNAs nucleares ou RNAs ribossômicos, participam do processamento de rRNAs durante a maturação da subunidade do ribossomo.	(Makarova <i>et al.</i> , 2013; Xing e Chen, 2018)
lnRNA	- Transcrição, tradução, localização de proteínas e integridade de estrutura celular.	(Ma <i>et al.</i> , 2013)
	- Podem regular a expressão de genes próximos.	(Chen, 2016; Kopp e Mendell, 2018)
circRNA	- Ligam-se a microRNAs ou outras moléculas, sendo reguladores transcricionais ou pós-transcricionais da expressão gênica.	(Du <i>et al.</i> , 2017; Meng <i>et al.</i> , 2017)
	- São inibidores competitivos de miRNAs, regulam de mecanismos de splicing alternativo, modulam a estabilidade do mRNA, regulam a transcrição do DNA e a translação de proteínas.	(Du <i>et al.</i> , 2017; Meng <i>et al.</i> , 2017; Li <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: elaborado pelo autor do trabalho.

Quadro 2 – Bases de dados sobre ncRNA

miRBase	http://www.mirbase.org	A base de dados miRBase é uma base para anotação e sequências de miRNAs publicadas. Cada sequência publicada representa a porção “hairpin” do transcrito de miRNA, com a informação do local e sequencia do miRNA maduro. Ambos, precursor e maduro, são disponíveis para busca, sendo esta podendo ser feita por nome, palavras-chave, referências e anotações. Todas as sequências e anotações estão disponíveis para download. O registro na miRBase proporciona aos descobridores (hunters) de miRNAs delimitar nomes únicos para novos miRNAs antes da publicação de seus resultados.
miRTarBase	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php	A base de dados miRTarBase apresenta mais de 3 mil e seiscentos miRNA-target interactions (MITs) que são coletados manualmente em servidores da literatura após filtragem sistemática em artigos relacionados a estudos funcionais de miRNAs. No geral as MITs coletadas são experimentalmente validadas por reporter assay, western blot, microarray and next-generation sequencing
piRBase	http://www.regulatoryrna.org/database/piRNA/	A base piRBase é manualmente alimentada por pesquisas sobre piRNAs que focam nas análises funcionais de piRNA, bem como nas anotações das sequências de piRNAs. Esta base apresenta cerca anotações de sequencias de mais 200 databases em cerca de 21 organismos, bem como classifica os piRNAs segundo sua biogênese de acordo com a anotação genômica. É possível também avaliar a interação dos piRNAs com os miRNAs alvos, bem como caracterizar os piRNAs segundos 8 tipos de câncer, dentre eles o câncer colorretal.
circBase	http://www.circbase.org	Nesta base é possível explorar dados públicos acerca de circRNAs, além de baixar python scripts necessários para avaliação de novos

		circRNAs em seus próprios dados de sequenciamento. Nesta base você poderá buscar sequências e anotações de circRNAs, buscar por meio de seus identificadores, descrição dos genes, posição no genoma, bem como exportar arquivos FASTA contendo sequências genômicas.
--	--	---

Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho.

1.5 Bases de dados

Com a evolução de métodos de avaliação e a enxurrada de dados gerados por essas novas tecnologias, foi necessário a criação cada vez mais de bases que possam comportar uma quantidade de informações que, não somente, armazenem esses dados, mas também possam tornar públicos estes. Assim, outros pesquisadores podem não somente validar os estudos publicados, mas também utilizar dos dados de maneiras diferentes, gerando novos estudos e até resultados diferentes daqueles inicialmente gerados. Assim, bases de dados como Cancer Genome Atlas Project (TCGA), Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE), Genome Wide Association Studies Catalog (GWAS Catalog), entre outras surgem para que pesquisadores, possam obter dados, gerar novas hipóteses e validar outras, melhorando assim o fluxo de informações e validação das mesmas.

1.5.1 TCGA

O TCGA é um projeto financiado pelo National Cancer Institute (NCI), o qual possui como objetivo disponibilizar uma base de dados com o perfil de diferentes tipos de tumor e suas apresentações. Esse processo se dá através da compilação de informações colhidas em bases de dados genômicas. As pesquisas disponíveis no TCGA incluem sequência de genoma e exoma completos, referências de metilação, expressão de RNA e dados clínicos (CHANDRAN *et al.*, 2016).

Quanto a disponibilização das informações, há uma parcela de livre acesso ao público, como também uma porção restrita. Entre os dados públicos se pode encontrar bases de sequenciamento, como valores de expressão genica (CHANDRAN *et al.*, 2016).

1.5.2 ENCODE

A ENCODE é um projeto colaborativo financiado pelo *National Human Genome Institute* (NHGRI) com enfoque em identificar regiões funcionais no genoma humano (Hong *et al.*, 2016). Seu lançamento ocorreu em 2003 a partir da colaboração entre grupos de pesquisa ao redor do mundo. Os resultados da ação colaborativa podem ser acessados em um banco de dados público que já passa de sua quarta fase de atualização (ZHAO *et al.*, 2018).

Hoje, os dados de alto rendimento do ENCODE tem sido base de grande parte das informações disponíveis a comunidade científica acerca do genoma humano. Além de colaborar com estudos que possuem esse enfoque, a base tem sido útil para captação de informações envolvendo temas como mecanismos de doenças, desenvolvimento de drogas, entre outros (ZHAO *et al.*, 2018).

1.5.3 GWAS

O GWAS Catalog é um banco de dados público, fundado em 2008 pela *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), que compila os resultados de pesquisa da GWAS (MACARTHUR *et al.*, 2017). O *GWAS Catalog* tem permitido identificar ligações entre inúmeros genótipos e fenótipos. Por isso, a ferramenta tem se firmado como repositório central de dados dessa natureza para a comunidade científica (MAGNO e MAIA, 2020).

A inclusão de dados no catálogo se dá por meio de pesquisa automatizada de literatura no PubMed em busca de estudos que se adequem aos critérios de elegibilidade da ferramenta. Critérios esses que perpassam pela inclusão de um GWAS baseado em array, com análise > 100000 SNP, cobrindo integralmente o genoma. Posteriormente, ocorre uma segunda revisão de inclusão nos critérios, assim como a extração dos dados através de um sistema de curadoria individual (BUNIELLO *et al.*, 2019).

A pesquisa de conteúdo é realizada através de barra única que permite a inclusão simultânea de especificidades como título, autor, periódico, característica relatada, característica mapeada (ontologia), descrições de amostras, genes e SNPs. Além disso, o mecanismo permite que ocorra o retorno de resultados para sinônimos dos termos propostos pelo pesquisador. Obtém-se resultados tabelados, organizados entre estudos, associações e características (MACARTHUR *et al.*, 2017).

1.5.4 STRING

STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) é uma base de dados que busca coletar e integrar informações sobre interações funcionais das proteínas expressas, consolidando dados de associação proteína-proteína conhecidos e previstos para um grande número de organismos. Existente desde o ano de 2002, essa base de dados é constantemente atualizada e melhorada a fim de fornecer maiores abrangência, usabilidade e controle de qualidade (SZKLARCZYK *et al.*, 2016).

As associações feitas pela STRING incluem interações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) entre proteínas, desde que ambas sejam específicas e possuam significado biológico. Essas associações são resultado de dados de pesquisa experimental, além de previsões de interação, realizadas a partir de análise sistemática de coexpressão, detecção de vias de sinalização compartilhadas através do genoma, busca de textos na literatura científica e transferência computacional do conhecimento de interação entre organismos, com base na ortologia dos genes (SZKLARCZYK *et al.*, 2016).

Para cada associação proteína-proteína armazenada na STRING, é fornecida uma pontuação. Essas pontuações (ou seja, os "pesos da borda" em cada rede) representam pontuações de confiança e são dimensionadas entre zero e um. Eles indicam a probabilidade estimada de que uma determinada interação seja biologicamente significativa, específica e reproduzível, dada a evidência de suporte. Para cada interação, a evidência de suporte é dividida em um ou mais "canais de evidência", dependendo da origem e tipo de evidência. Na versão da Web, esses canais são diferenciados em cores e compõem uma rede de interações que se forma como uma imagem (SZKLARCZYK *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar impacto da expressão diferencial de miRNAs e de SNPs no prognóstico de pacientes com câncer colorretal utilizando abordagens integrativas de bases de dados e dados primários de pacientes da região norte do Brasil, além de potenciais impactos na via de sinalização do gene KRAS, por meio de técnicas de bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão diferencial de miRNAs e relação com a via de sinalização do gene *KRAS* e *SP1* pacientes com câncer colorretal utilizando análise integrativa de bases de dados TCGA e ENCODE.
- Avaliar a expressão diferencial de miRNAs entre os lados direito e esquerdo do cólon de pacientes saudáveis e pacientes com câncer utilizando análises de bioinformática.
- Descrever a presença de “*Single Nucleotide Polimorphism- SNPs*” encontrados em amostras de tecido de pacientes com câncer colorretal em comparação com tecido tumoral adjacente e potenciais impactos destes nas vias de sinalização dos genes *HBEGF* e *TRFC* em pacientes com câncer colorretal estágio inicial.

3. MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

Os dados de coleta primária de participantes com câncer colorretal foram coletados como parte da pesquisa “Avaliação de marcadores metabólicos endógenos e expressão de miRNAs sobre o prognóstico, resposta ao tratamento e toxicidade em indivíduos com Câncer Colorretal”, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), sob o parecer nº 2.001.795 (ANEXO A). Além disso, outras amostras foram obtidas pelo projeto “Avaliação da expressão de miRNAs e impacto no prognóstico em indivíduos com câncer colorretal no estado do Pará” aprovado pelo CEP da Universidade da Amazônia (UNAMA), sob o parecer nº 2.001.795 (ANEXO B). Todas as normas regulamentares (ANVISA 466/12 e 510/2016) para estudos com materiais biológicos foram devidamente seguidas.

3.2 Revisão sistemática

O método da revisão sistemática realizada seguiu as recomendações da *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Protocol* (PRISMA) e da *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. O método completo, resultados e discussão estão completamente descritos no capítulo referente da sessão de resultados.

3.3 Amostras de tecidos tumorais dos pacientes

Dentro de nosso protocolo utilizamos dois tipos de amostras de **tecidos** biológicos dos participantes:

3.3.1 Tecidos tumorais frescos

Cinco (05) Amostras de tecido tumoral e 1 amostra de tecido adjacente foram coletadas no ato cirúrgico em diferentes hospitais de Belém (PA). As amostras foram retiradas da peça tumoral pelo mesmo pesquisador, após a retirada da mesma em bloco pelo cirurgião. Este pesquisador foi orientado que retirasse a amostra de tecido tumoral do mesmo segmento do cólon ou reto de onde se encontrava o tumor do paciente, respeitando margem mínima

estabelecido pelo cirurgião no ato cirúrgico. Essas amostras foram armazenadas em DNA/RNA ShieldTM (Zymo Research) no Laboratório de Culturas de Tecidos e Citogenética, no Instituto Evandro Chagas, em Belém (PA) – SAMAM/IEC. As amostras foram conservadas em freezer a -80°C até o início do procedimento de extração de DNA.

3.3.2 Tecidos tumorais parafinados

As 05 (cinco) amostras de tecido tumorais previamente armazenadas em banco de amostras biológicas parafinadas em centro de ensino e pesquisa em Oncologia na cidade de Belém – Oncológica do Brasil Ensino e Pesquisa. Estas amostras advinham de tecido tumoral primário de pacientes que necessitaram realizar testes de mutações genéticas para determinação de seu tratamento.

3.4 Extração e quantificação do DNA dos tecidos tumorais e adjacentes utilizados

O DNA foi extraído por meio do kit Reliaprep gDNA tissue Miniprep System da Promega, seguindo as recomendações do fabricante. A concentração do DNA foi determinada por análise fluorimétrica (Qubit 4 - Thermo Fisher Scientific). Para verificar a integridade do DNA genômico extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRedTM (UNISCIENCE).

3.5 Hibridização genômica comparativa em arrays (aCGH) para análises de Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNPs)

Para o aCGH foram utilizadas as seguintes matrizes da Agilent: SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K (Agilent), para a análise simultânea SNPs e a análise de alterações do número de cópias (CNV) no genoma. O processamento do aCGH consiste em hibridização, lavagem e escaneamento. A Hibridização foi feita por 48 horas a 65°C. A lavagem da matriz foi realizada com o uso dos reagentes Agilent Oligo aCGH/Chip-on-Chip Wash Buffer 1 e Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2.

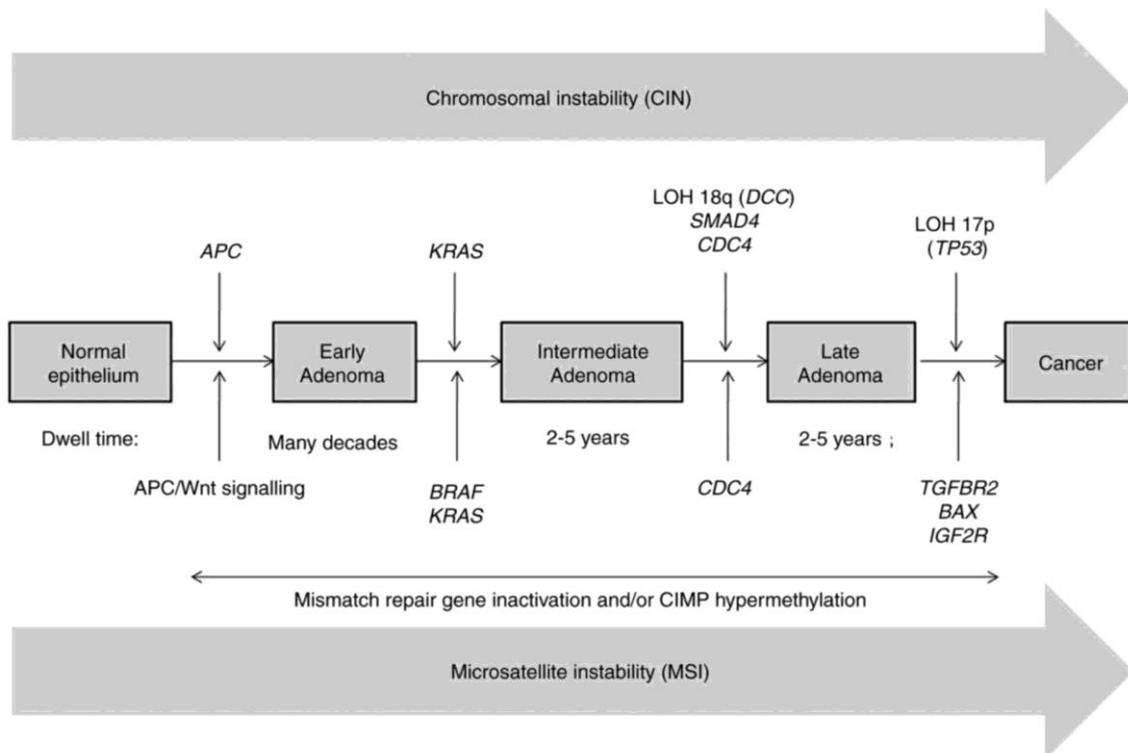
Foi utilizado a anotação do genoma humano GRCh37/hg19 proveniente do Genome Browser da University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

3.6 Avaliação dos SNPs

Para todas as amostras avaliadas foram geradas bibliotecas por meio do programa Agylent Cytogenomics. Todas as bibliotecas mapeavam os mesmos SNPs, a lista de SNPs avaliados encontra-se no material suplementar deste documento (Material Suplementar x). Alguns dos SNPs avaliados são descritos não por seu genótipo, mas sim por “NN” que representa SNPs não possível de avaliar

Dessa forma as 5 amostras foram comparadas enquanto a presença de genótipo mutado com a amostra de tecido normal. O script foi desenvolvido por meio da linguagem Python. Após a comparação entre as amostras foi desenvolvida estratégia de avaliação e predição de alvos genéticos para os SNPs utilizando a plataforma GWAS Catalog (Szklarczyk *et al.*, 2016). Após avaliação de genes relacionados com os SNPs avaliados, foi utilizada a plataforma STRING para montagem de redes de interação e avaliação de vias de sinalização para genes alvos na cascata de desenvolvimento do CCR (Nguyen e Duong, 2018). Os genes elencados da cascata de desenvolvimento estão descritos na figura abaixo (figura 1).

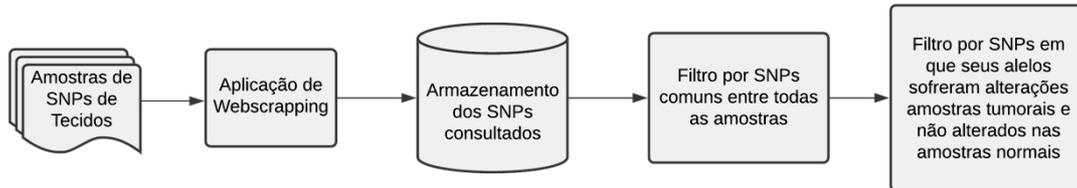
Figura 1 – Genes envolvidos nas vias de sinalização e carcinogênese do câncer colorretal



Fonte: NGUYEN & DUONG, 2018.

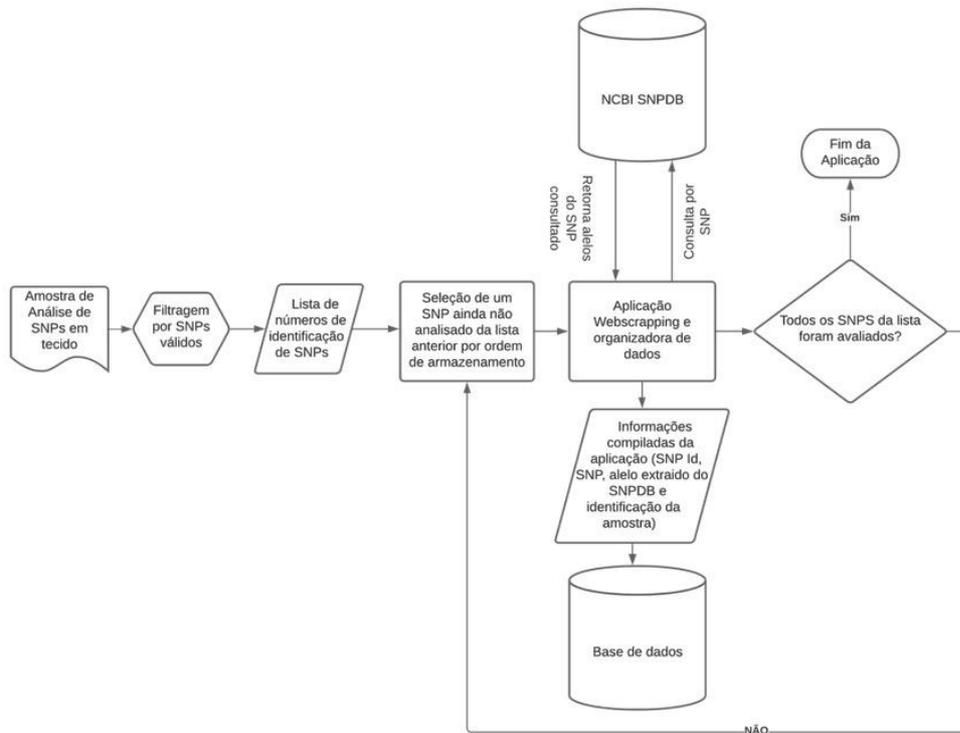
Após a avaliação das vias de sinalização e *pathways* relacionados utilizou-se o programa cytoscape para apresentação gráfica das redes de interação (figura 2 e Figura 3).

Figura 2 – Fluxograma geral de avaliação dos processos de análise



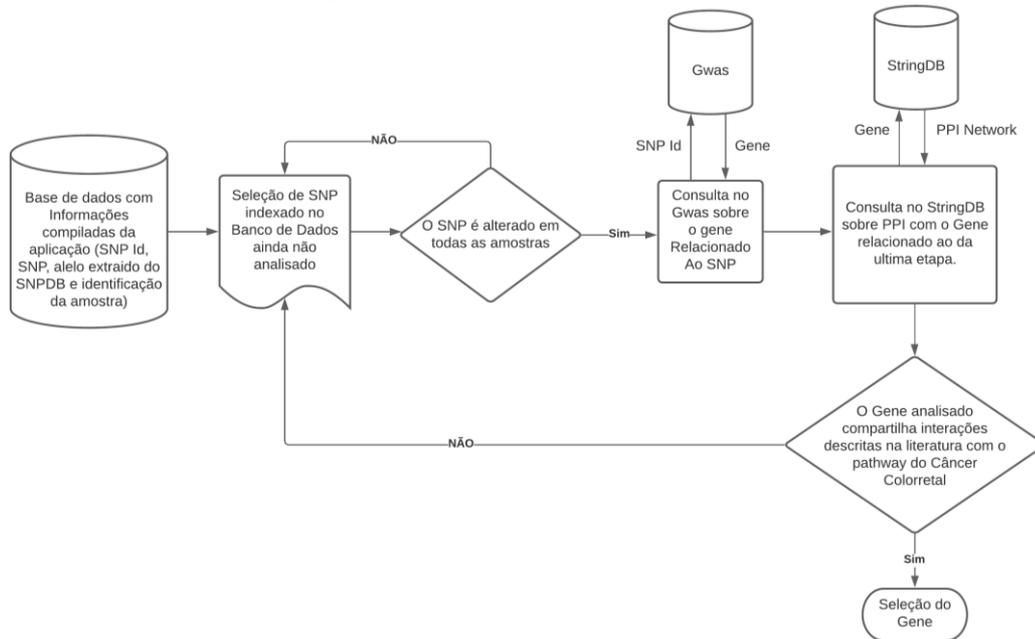
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 – Fluxograma de análise e validação dos SNPs analisados



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4 – Fluxograma da análise integrativa entre bases de dados dos SNPs obtidos



Fonte: Dados da pesquisa

3.7 Análise de expressão diferencial de miRNAs

a) Obtenção de dados no “*The Cancer Genome Atlas Program*”:

Para obtenção dos dados relacionados a expressão de miRNAs de pacientes com câncer colorretal do TCGA foi utilizado pacote do programa R (versão 3.6), chamado TCGAbiolinks (Colaprico *et al.*, 2016). Os parâmetros para download dos dados foram avaliados segundo:

- i) *Project*: Foram determinados os projetos Cancer Genome Atlas Rectum Adenocarcinoma (TCGA-READ) e Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD). Estes projetos foram consultados na base de dados on-line TCGA - “GDC- Data Portal” (<https://portal.gdc.cancer.gov>) como projetos que apresentavam somente dados e amostras de pacientes com câncer de cólon e reto, bem como tecido adjacentes coletados destes pacientes de maneira padronizada e similar em ambos.
- ii) *Data Type*: *miRNA gene quantification; miRNA Expression Quantification*
- iii) *Data Category*: *Gene expression.; Transcriptome profiling*
- iv) *Experimental strategy*: *miRNA-Seq*
- v) *Typesample*: *TP- Primary solid tumor / NT- Solid Tissue Normal*

O projeto Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC-2) apresentava também os mesmos dados relacionados a tipo, categoria e estratégia experimental. Porém, por

ser um projeto que destoava dos dois anteriores (COAD e READ) em seu formato de coleta das amostras e padronização de processos não foi incluído na análise conjunta.

b) Obtenção de dados no “*Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)*”

Para obtenção dos dados brutos de sequenciamento do ENCONDE inicialmente consultamos a base on-line (<https://www.encodeproject.org>). Em seguida, foi estabelecido filtro para small-RNA-Seq, seguido de escolha por tecido (cólón sigmoide e transverso). Foram encontrados 8 amostras (4 cólon transverso e 4 de cólon sigmoide) sequenciadas de 4 pacientes (2 homens e 2 mulheres).

Small-RNA-Seq>>tissue>>sigmoide colon and transverse colon.

Em seguida utilizou-se o terminal Linux para download das amostras em formato fastq.

c) Análise de expressão diferencial de miRNAs e predição de alvos

i. Expressão diferencial TCGA (TP X NT) - Projetos TCGA-COAD e TCGA-READ

Para análise de expressão diferencial de miRNAs utilizando os controles adjacentes saudáveis do TCGA, foram utilizados scripts pré-definidos pelos desenvolvedores do pacote TCGAbiolinks (COLAPRICO, 2016) no software R. Este, por sua vez, utiliza o pacote *edgeR* (ROBINSON *et al.*, 2010) para avaliação dos miRNAs diferencialmente expressos.

Para construção de *Volcano Plots* foi utilizado o pacote EnhancedVolcano. Os parâmetros utilizados para definição de miRNAs que apresentaram significativamente diferencialmente expressos foram: $FDR < 10^{-6}$ e $\logFC > 3$.

Para construção de mapas de calor e cluster segundo grupos clínicos foram utilizados o pacote *ComplexHeatmap*.

ii. Expressão diferencial amostras TCGA READ/COAD e ENCODE: Cólón Direito x Cólón Esquerdo

Para análise de expressão diferencial de miRNAs utilizando amostras obtidas de pacientes saudáveis por meio do ENCODE, foi utilizado *miARma-Seq pipeline* (Andrés-León, 2016) para *Known miRNAs*. Nesse pipeline utilizou-se:

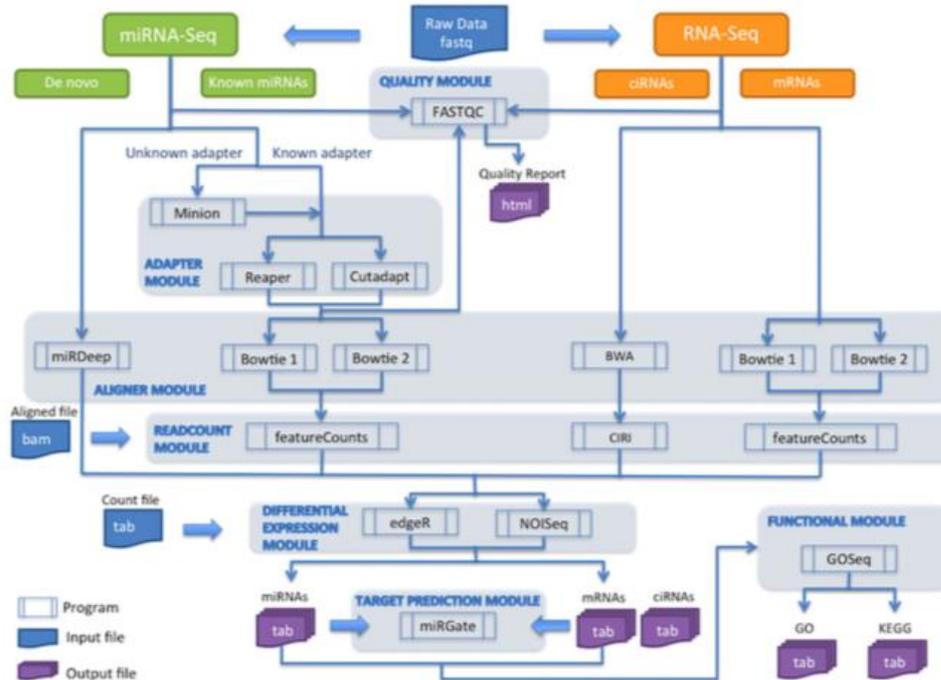
Adapter Module: Cutadapt

Aligner Module Bowtie 1:

Differential Expression Module: edgeR

Como output do pipeline foi obtido os arquivos de *FeadtureCounts* como matriz de *readcounts* para montagem de matriz global a posteriori. Além disso, os dados de expressão diferencial entre os tecidos do cólon sigmoide e cólon transverso foram obtidos em formato tvs.

Figura 5 – Workflow do protocolo de avaliação para predição de alvo genético dos miRNA



Fonte: ANDRÉS-LEÓN, 2016.

Para avaliação da expressão diferencial entres os cólons direito (Cólon Ascendente, Flexura Hepática, Cólon Transverso) e esquerdo (Flexura Esplênica, Cólon Descendente, Sigmoide e Reto) comparando os dados do TCGA x TCGA e ENCODE X ENCODE foi utilizado mesmo procedimento descrito no item **c.i**.

iii. Expressão diferencial TCGA *readcounts* x ENCONDE *readcounts*

Para análise de expressão diferencial de miRNAs dos dados disponibilizados pelos projetos do TCGA em comparação com os dados de expressão de miRNAs obtidos pelo *pipeline miARma-seq* (ANDRÉS-LEÓN, 2016) de amostras do ENCODE como controles saudáveis foi utilizado o *Differential expression module* do *pipeline miARma-seq* (ANDRÉS-LEÓN, 2016).

Inicialmente, foi necessário montar uma matriz de *readcounts* global dos dados obtidos do TCGA e ENCODE. Para isso utilizou-se algoritmo desenvolvido no software Python 3. Este algoritmo tem por finalidade anexar todos os dados de *readcounts* individuais de cada paciente

disponibilizados pelo TCGAbiolinks (COLAPRICO, 2016) e os dados de *readcounts* obtidos pelo *pipeline miARma-seq* na análise das amostras do ENCODE.

Para definição dos miRNAs significativamente diferencialmente expressos, construção dos *Volcano Plots e Heatmaps* foram utilizadas a estratégia descrita no item **c.i.**

iv. Predição de genes alvos dos miRNAs

Para predição de genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, foi utilizada a base de dados miRTarBase (HSU *et al.*, 2011) . Nesta base é possível avaliar o nível de evidência para a validação dos genes alvos para miRNAs já descritos e categorizados na base miRBase (KOZOMARA, 2014) . Esta base define:

- *High evidence*
- *Low evidence*

Além disso, a base *miRTarBase* (HSU *et al.*, 2011) fornece dados dos estudos de validação dos genes alvos dos miRNAs e suas relações e potenciais impactos na expressão dos genes e suas vias de sinalização.

3.8 Análise estatística

As variáveis categóricas foram descritas segundo suas frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas contínuas que apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$ – Teste Shapiro Wilk) foram descritas segundo média e desvio padrão. Já as variáveis quantitativas contínuas de distribuição não normal ($p < 0,05$ – Teste Shapiro Wilk) foram descritas segundo mediana e percentis 25% e 75%.

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de capítulos:

Capítulo 1: Noncoding rnas and colorectal cancer: a general overview.

Capítulo 2: Associação da expressão de miRNA e prognóstico em pacientes com câncer colorretal: uma revisão sistemática.

Capítulo 3: Avaliação da expressão de mirnas e relação com a via de sinalização do gene KRAS e SP1 em pacientes com câncer colorretal: avaliação integrativa de bases de dados.

Capítulo 4: Os dois lados do mesmo Cólon- O cólon de pessoas normais é diferente? Uma avaliação integrativa de base de dados.

Capítulo 5: Avaliação do impacto de snps nas vias dos genes HBEFG e TRFC em pacientes com câncer colorretal estágio inicial em centro de pesquisa na região amazônica brasileira - análise integrativa de bases de dados e técnicas de bioinformática.

4.1 Capítulos 1 - Noncoding rnas and colorectal cancer: a general overview

NONCODING RNAS AND COLORECTAL CANCER: A GENERAL OVERVIEW

(Publicado em MicroRNA (ISSN- 2211-5374))

Jonathan Souza Sarraf 1,2, Taynah Cascaes Puty 1,3

Emanuely Magno da Silva 1,4

Thais Suellen Ramos Allen 1,5

Yasmim Souza Sarraf 1,4

Luis Eduardo Werneck de Carvalho 1

Fernando Adami 1,3

Edivaldo Herculano Correa 6

1 Oncológica do Brasil Ensino e Pesquisa

2 Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular- Universidade Federal do Pará

3 Centro Universitário Saúde ABC

4 Universidade Federal do Pará

5 Universidade do Estado do Pará

6 Instituto Evandro Chagas

Corresponding author: Jonathan Souza Sarraf. Address: Av. Visconde de Souza Franco 570, zip-code: 66053-000; Tel: +55 91 3223-5800. Phone: +55 91 98029-5594. E-mail

jonathansouzasarraf@gmail.com;

Support: CAPES Doctoral Scholarship; Oncológica do Brasil Ensino e Pesquisa; CNPQ Scholarship

Scientific Initiation.

Conflict of interest statement: no conflicts of interest

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) is the second most prevalent cancer in the world when nonmelanoma skin cases are not considered. Different epigenetic mechanisms play a role in the development of cancer. Noncoding RNAs (ncRNAs) are RNA molecules transcribed from

noncoding regions of the genome. These are divided into sncRNAs (small noncoding RNAs: <200 nucleotides - including miRNAs [microRNAs], siRNAs [small interfering RNAs], piRNAs [piwi-interacting RNAs], snoRNAs [small nucleolar RNAs]) and lncRNAs (long noncoding RNAs: >200 nucleotides – including circular RNAs [circRNAs]). ncRNAs can act as oncogenes or as tumor suppressor genes in CRC and are potential biomarkers of diagnosis, with possible clinical implications. **Objective:** This article aims to make a general review around all types of non-coding RNAs and influence in colorectal cancer, focus in biomarkers of CRC and their possible applications in clinical practice, as well as review their biogenesis and functions. Furthermore, we seek to summarize possible databases available for new searches and studies that require sequence annotation, comparison sequences and target prediction for ncRNAs with the hope of gathering information that can aid in the process of understanding and translating the use of ncRNAs into clinical practice.

Key-words: Colorectal Cancer, non-coding RNAs, miRNAs, piRNAs, siRNAs, sno-RNAs, circ-RNAs, lnc-RNAs

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second most prevalent cancer in the world when nonmelanoma skin cases are not considered. According to the World Health Organization, there were approximately 880 thousand deaths from CRC in 2018 (1). The National Cancer Institute estimates that in the USA in 2019, there were 149,660 new diagnoses and 51,020 deaths due to colorectal cancer, which represents 8.4% of the cancer mortality in this country (2). In addition, global statistics predict that there will be more than 1.5 million new cases in the world by 2030 (3).

CRC is a heterogeneous disease involving several clinical manifestations and molecular and genetic changes (4). Currently, it is known that CRC arises from benign precursor polyps and shows a progressive accumulation of genetic and epigenetic changes, which contribute to the development of the tumor (5). Different epigenetic mechanisms play a role in the development of cancer, such as DNA methylation, histone modifications, nucleosome placement and, in particular, noncoding RNAs (4).

Noncoding RNAs (ncRNAs) are RNA molecules transcribed from noncoding regions of the genome; therefore, they do not have an open reading frame and are not translated into proteins (6). ncRNAs are mainly divided into two categories based on their length, using a length of 200 nucleotides as the cutoff point. ncRNAs with less than 200 nucleotides are

referred to as sncRNAs (small noncoding RNAs) and include miRNAs (microRNAs), siRNAs (small interfering RNAs), piRNAs (piwi-interacting RNAs) and snoRNAs (small nucleolar RNAs). NcRNAs with more than 200 nucleotides constitute a class of ncRNAs known as lncRNAs (long noncoding RNAs) (7-9). NcRNAs can be modified by several inherited genetic and epigenetic changes, in addition to structural and transcriptional variations. All of these factors contribute to ncRNA deregulation and are implicated in the etiology, pathophysiology and prognosis of cancer (6).

NcRNAs can act as oncogenes or as tumor suppressors and can have utility in diagnosis or predicting prognosis, with possible clinical implications. Consequently, it is important to review and summarize the main finding to generate a better understanding of the mechanisms and possible applications of ncRNAs in clinical practice (10, 11). Thus, this review seeks to describe the utility of ncRNAs as clinical biomarkers of patients with CRC and their possible applications in clinical practice.

2. Background

The discovery of ncRNAs was critical for the understanding of simple DNA sequences, as our genes are insufficient to generate the global outcomes of all the processes that generate genetic regulation. Each ncRNA can regulate different processes and have different functions (Table 1). These functions range from complexes that silence messenger RNA (mRNA) (12, 13) to competitive inhibition of mRNA targets and regulation of splicing mechanisms, among others (14-16). Therefore, ncRNA can assist in the integration of more complex processes within the cell, thus explaining the differential expression of genes in different tissues, environments and situations. At present, given the volume of data generated by widely available methods, including microarrays and next-generation sequencing, it is possible to use databases to search for sequences, annotations, predicted targets and various other data for the study of ncRNAs (Table 2). In this study, we will review the biogenesis, functions and potential actions as biomarkers of short and long ncRNAs in carcinogenesis with a focus on CRC.

Table 1 – ncRNAs and their functions

Type	Function	References
miRNA	- Gene silencing, affecting cell growth and proliferation	(17, 18)
siRNA	- Gene silencing through participation in the RNA interference complex	(12, 19-21)

piRNA	- Promotes genome rearrangements in spermatogenesis, epigenetic regulation of DNA, regulation of proteins and silencing of transposons	(13, 22, 23)
snoRNA	- Biochemical modifications of other RNAs and miRNA precursors, splicing and telomerase activity	(24)
	- Small nuclear RNA or ribosomal RNA modification, rRNA processing during the maturation of ribosomes	(24, 25)
lncRNAs	- Transcription, translation, protein localization and cell structure integrity	(26)
	- Expression regulation of nearby genes	(27, 28)
circRNA	- Bind to microRNAs or other molecules, act as transcriptional or posttranscriptional regulators of gene expression	(29, 30)
	- Competitive inhibitors of miRNAs, regulate alternative splicing mechanisms, modulate mRNA stability, regulate DNA transcription and protein translation	(29-31)

Table 2 – Databases of ncRNA data

Database	Link	Description
miRBase	http://www.mirbase.org	The miRBase database contains annotation and published miRNAs sequence data. Each published sequence represents the “hairpin” portion of the miRNA transcript, with information on the location and sequence of the mature miRNA. Both precursor and mature RNAs are available to search, which can be done by name, keyword, reference and annotation. All strings and annotations are available for download. miRBase registration provides miRNA researchers with unique names for new miRNAs before publishing their results.
miRTarBase	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php	The miRTarBase database has more than 3,600 miRNA-target interactions (MTIs) that are manually collected on literature servers after systematic filtering of articles related to functional studies of miRNAs. The collected MTIs are experimentally validated by reporter assays, western blot,

microarrays and next-generation sequencing.

piRBase	http://www.regulatoryrna.org/database/piRNA/	The piRBase database is manually fed by research on piRNAs that focuses on functional piRNA analysis, as well as annotations of piRNA sequences. This database presents annotations of sequences from over 200 databases in approximately 21 organisms, as well as classifies piRNAs according to their biogenesis according to the genomic annotation. It is also possible to evaluate the interaction of piRNAs with target miRNAs, as well as to characterize piRNAs according to 8 types of cancer, including colorectal cancer.
circBase	http://www.circbase.org	With this database, it is possible to explore public data about circRNAs, in addition to downloading python scripts needed to evaluate new circRNAs in newly generated sequencing data. Researchers can search for circRNA sequences and annotations and search through their identifiers, gene descriptions, and position in the genome, as well as export FASTA files containing genomic sequences.

1. Short ncRNAs

1. MiRNA

MiRNAs are short, single-stranded noncoding RNAs composed of 19 to 25 nucleotides. MiRNAs are responsible for the degradation or blocking of the translation of messenger RNAs (mRNAs) (32, 33) by imperfect pairing with sequences in the 3'-UTR of the target mRNAs, inhibiting protein synthesis (32) and thus modulating the posttranscriptional response (16).

MiRNAs are processed from precursor molecules (pri-mRNAs), which are transcribed by RNA polymerase II from independent genes or represent introns of genes encoding proteins (32). After formation, miRNAs must be excised to cause gene silencing, and then they are actively released from cells in microvesicles or exosomes or linked to proteins through two endoribonucleases (17, 18). The expression levels of each miRNA vary in different tissues, organs and body secretions (serous, plasma, urine and tears) and are precisely regulated (15, 17, 33).

Some miRNAs are specific to each tissue and, when overexpressed, can suppress genes responsible for inhibiting growth and proliferation, acting directly on processes of carcinogenesis and tumor evolution. Among them, we highlight miR-224 (14), miR-122 (34), miR-21 (35-38) and miR-155 (39). However, negative regulation of other specific miRNAs, miR-150 (40), miR-126 (41, 42), miR-100 (43), miR-16 (44) and, in some studies, miR-21 (45), can increase expression. Genes responsible for promoting cell growth and proliferation result in the development and progression of cancer (16). The process of unregulated expression of miRNAs in human cancers is not fully understood.

In addition to acting directly in the process of carcinogenesis, miRNAs have been used as prognostic and predictive biomarkers for the monitoring and treatment of patients with CRC (16). MiR-21 (38), for example, may be overexpressed in patients with CRC, inducing dysregulation of programmed cell death by targeting *Pdcd4*, thus promoting invasion, extravasation and metastasis of cancer cells (16, 36). Therefore, high miR-21 levels are associated with a lower probability of clinical remission and with a more advanced stage of the tumor at the time of diagnosis than low miR-21 levels (35).

A study by Chen, Xia (46) showed that high levels of miR-19a favored resistance to the chemotherapy regime FOLFOX in patients with advanced cancer. Some microRNAs, such as miR-200, are associated with aggressive CRC phenotypes, while others have a correlation with increased dysplasia; for example, high miR-12 is related to a worse prognosis (lower overall survival and disease-free survival) than low miR-12 (34).

Additionally, in CRC, miR-126 presents lower levels than in healthy tissues, thus depressing the function of VCAM-1 and causing decreased intercellular adhesion, adherence between the epithelium-leukocytes and local inflammation (16, 41). Therefore, it is correlated with stage IV tumors, a high degree of malignancy, and tumor invasion and colonization, in addition to being associated with the instability of tumor microsatellites (42), which confers a poor prognosis for these patients. MiR-224, expressed at high levels in CRC, produces a pro-

metastatic effect through SMAD4 regulation and is present mainly in stable microsatellites, being related to a low overall survival and metastasis-free survival in patients with CRC (14).

2. *SiRNA*

SiRNA (small interfering RNA) is a class of dsRNA (double-stranded RNA) of 21 to 23 nucleotides in length with a guide (antisense) and a passenger (sense) strand (12, 19-21). SiRNA participates in RNA interference (RNAi), a natural regulatory genetic process mediated by RNA. It binds to a multienzyme complex, including the RNA-induced silencing complex (RISC) and Argonaute 2 (AGO2) (12, 19-21); ultimately, the target mRNA is inactivated, leading to sequence-specific genetic silencing (19, 21), and the cleaved mRNA leaves the AGO2-RISC complex to release it, allowing it to attack another target mRNA (12, 19, 21). Using siRNA molecules, RNAi can selectively suppress any gene in the genome (19, 21). SiRNA can be used to treat many diseases, such as cancers (ovarian, breast, prostate and lung) (47), viral infections (hepatitis B and HPV), autoimmune diseases and others (12, 20, 47).

In instances of cancer, siRNAs can serve as targets of treatment based on their silencing of genes critical for tumor progression or drug resistance (48). Therefore, the selection of suitable genetic targets is one of the prerequisites for RNAi-based anticancer therapy. Ideally, a candidate gene should 1) be critical for tumor progression or drug resistance; 2) correlate with reliable biomarkers that can be used to assess biological and clinical responses after RNAi therapy; and 3) be preferentially expressed in target tumors over normal tissues (21, 48). In recent years, with the establishment of comprehensive databases of nucleotide sequences, such as human genomic databases and disease gene banks, the ability to identify critical oncogenes has dramatically increased (48).

In CRC, siRNAs are being used as therapeutic devices. Studies have demonstrated that silencing the VEGF gene with siRNA is able to suppress tumor proliferation, inhibit angiogenesis and induce apoptosis in HCT116 cells (a cell line derived from colorectal cancer) (49-51).

In one study (52), the ERCC1 gene (excision repair cross-complementing group-1), which is responsible for inducing CRC cell resistance against oxaliplatin, was inhibited by siRNA. In another study by Peng, Wu (53), siRNA was used as a target for B7-H4, a transmembrane protein of the B7-CD28 family expressed in the colon and considered an inhibitor of T cell-mediated immunity. SiRNA effectively suppressed the proliferation, invasion and migration of

LOVO cells and CRC cells, inhibiting the increased metastatic potential of CRC cells induced by CXCL12/CXCR4 and the phosphorylation of JAK2/STAT3.

3. *PiRNA*

PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are a class of small noncoding RNAs of approximately 24 to 31 nucleotides. PiRNAs are predominantly present in the germline but are also found in somatic cells (13, 23). This class was first identified in 2001 in research on *Drosophila* (13, 23). Currently, there are more than 30,000 piRNAs described in humans (22).

PiRNAs receive this name because they are closely linked to PIWI proteins, which belong to the Argonaute protein group involved in the mechanisms of repression of transposable elements and in spermatogenesis (13). These noncoding RNAs bind to PIWI proteins, forming a complex that can interfere with several cellular mechanisms, such as genome rearrangement in spermiogenesis, epigenetic regulation (for example, DNA methylation), protein regulation and transposon silencing (13, 22, 23).

The different distinct piRNA sequences originate specifically from the genome, known as piRNA clusters, which are mainly located in pericentromeric and subtelomeric chromosomal regions (13, 54). These sequences have great diversity, generating millions of unique piRNAs with few characteristics in common; differences between two piRNAs can include a change of the final nucleotide of the 5' tip or a change in the position of adenosine (23, 55).

The biogenesis of piRNAs occurs through the transcription of each cluster of genes or through individual transposons, generating a long precursor called a pri-piRNA (13, 56). After transcription, this precursor is transported to the cytoplasm through cytoplasmic bodies present in the mitochondrial membrane (13). In the cytoplasm, pri-piRNAs are processed by enzymes, generating smaller sequences that will bind to PIWI proteins (55, 56). The piRNA+PIWI complex is directed back to the nucleus, where it binds to its target DNA by pairing complementary bases (56).

Regarding cancer, piRNAs can participate in several mechanisms related to tumor biogenesis, proliferation and resistance to chemotherapy (57). Among the mechanisms of carcinogenesis, piRNAs regulate DNA methylation of cancer-related genes. For instance, studies show that piR-021285 is related to methylation in several types of cancer, both its wild-type form and its cancer variants (57). Other studies have identified a relationship between the inhibition of piR-823 and the reactivation of tumor suppressor genes through methylation (58). In addition, piRNAs are responsible for maintaining the integrity of the genome by silencing

transposons related to several cancer types, which may affect genes such as p53 and LINE-1 (57).

PiRNAs are also able to maintain the capacity for cancer cell proliferation. They act in the conservation of tumor stem cells; for example, piR-932, which is expressed at high levels in breast cancer, acts together with PIWIL2 to preserve tumor stem cells (57). As resistance to chemotherapy is a characteristic of tumor stem cells, piRNAs are also related to the chemoresistance of tumors.

Many piRNAs specifically related to colorectal cancer have already been identified as participating in carcinogenesis. For example, piR-1245 is often overexpressed in CRC, accelerating tumor growth and promoting tissue migration and invasion; in addition, piR-1245 is related to several clinical risk factors, such as the presence of metastases, and is related to overall patient survival (23, 59). PiR-54265, in addition to promoting all the mechanisms mentioned above, acts in resistance to 5-FU and oxaliplatin through interactions with the PIWIL2/STAT3/pSRC complex and is related to disease-free survival and overall survival (23). Due to its actions, piR-54265 has already been studied as a potential therapeutic target in CRC, and studies have demonstrated that treatment with inhibitors of this piRNA can suppress tumor growth and metastasis (60).

4. *SnoRNA*

Small nucleolar RNAs (snoRNAs) are a group of noncoding RNAs that perform several biological functions, including biochemical modifications of other RNAs and miRNA precursors, splicing and telomerase activity (24). The snoRNAs can be divided into two families, those with the RNA box C/D motif and those with the box H/ACA motif, based on structural similarity and biochemical functions. C/D snoRNAs form a single loop attached to a short terminal helix and contain duplicate elements. Box H/ACA snoRNAs mainly take the form of two symmetrical loops, where box H is between loops and box ACA is near the 3'-end (61, 62).

There is also a subset of snoRNAs known as small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs), which participate in the modification of small nuclear RNAs (snRNAs) or ribosomal RNAs and in the processing of rRNAs during maturation of the ribosome (24, 25).

The sno/scaRNAs follow a unique biosynthetic pathway before being transported to the bodies of Cajal (61). The C/D and H/ACA sno/scaRNAs are synthesized, processed, assembled in the nucleoplasm with their respective proteins and transported to the body of Cajal, located

in the nucleus of the cell. Transcription via assembly of RNA polymerase II and RNP occurs simultaneously (61).

Defects in the maturation and function of ribosomes can cause changes in vital processes and lead to diseases, including the transformation of normal cells into tumor cells (63). As snoRNAs are involved in the regulation of posttranscriptional modification of ribosomal RNAs, it is assumed that their levels may affect the physiological conditions of cells, tissues and organs (63). Thus, changes in their expression can be a sign of disease development. The dysfunction of several snoRNAs has been associated with the development of cancer, and some of these molecular mechanisms have been described. Thus, snoRNAs represent a new class of therapeutic targets in oncology, but their utility needs to be verified *in vivo* (64, 65).

In general, snoRNAs are potential biomarkers because they are stable in circulation and in biological fluids, such as urine (61). In addition, many snoRNAs are tissue-specific, so they can be used to restrict a disease process to one location (61). Some research has focused on identifying snoRNA signatures for CRC to be validated as biomarkers and therapeutic targets that ultimately benefit patients (66).

A study analyzing four types of snoRNA in 274 colorectal tissues from three independent cohorts and six CRC cell lines demonstrated that the 4 snoRNAs analyzed (SNORD76, SNORD78, ACA11 and SNORA42) had overexpression in CRC tissues compared with corresponding normal mucosa tissues. However, the expression of SNORA42 was negatively correlated with overall survival and identified patients with a high risk of recurrence and poor prognosis in stage II CRC. In addition, SNORA42 overexpression was associated with distant metastases and poor outcomes in patients with colorectal cancer during the clinical validation phase. Thus, SNORA42 seems to be a promising biomarker in patients with CRC (67).

Similarly, SNORA21 overexpression was observed in colorectal adenomas and CRC. When we evaluated the clinical significance of SNORA21 in two independent cohorts of tumor samples from patients with CRC, it was observed that there were significant associations between high SNORA21 expression and invasion, metastasis and tumor progression in patients with CRC. In addition, in primary CRCs with low levels of SNORA21 expression that had metastasized to the liver, SNORA21 levels were significantly elevated in metastatic sites. Therefore, SNORA21 is suggested as a prognostic marker for distant metastases in CRC (68).

Some snoRNAs remain intact and stable in plasma and serum samples, which allows them to be good biological markers in clinical practice. This is the case with snoRA15, snoRA41 and snoRD33, which were analyzed in 44 CRC tissue samples. The results showed

that the changes in snoRA15, snoRA41 and snoRD33 were correlated with prognosis in CRC. In addition, a strong association was found between the levels of expression of these snoRNAs and metastatic lymph nodes, degree of tumor differentiation and TNM stage. Therefore, they can be potential markers for the prognosis of CRC (69).

2. *Long ncRNAs*

1. *LncRNA*

Long noncoding RNAs (lncRNAs) are those that are longer than 200 nucleotides, and these are the most common ncRNA in the human genome. Only a small number of lncRNAs have been functionally well characterized (70). It is known that they play a significant role in a wide variety of biological processes that include transcription, translation, protein localization and cell structure integrity (26). Most lncRNAs in eukaryotes are produced by RNA polymerase II (27).

lncRNAs are also responsible for the integrity of the nuclear structure and can regulate the expression of nearby genes (acting in cis at the nucleus) or genes in other parts of cells (acting in trans at the nucleus or cytoplasm) by interacting with proteins, RNAs and DNAs (27, 28). lncRNAs can positively or negatively regulate gene expression through multiple mechanisms, including recruiting transcription factors or chromatin-modifying complexes to their DNA targets, forming heterogeneous complexes of nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) or interacting directly with RNAs and DNAs via base pairing (27).

It has been suggested that lncRNAs can regulate the progression of cancer and the development of many human diseases (26). Carcinogenesis is associated with general dysregulation of different biomolecules, including lncRNA (71). This deregulation can be observed not only at the intracellular level but also at the level of body fluids (71), thus serving as a potential biomarker.

Abnormally expressed lncRNAs have been found in CRC but are not completely understood. Some studies suggest that lncRNAs can be used as biomarkers (66). Some of these lncRNAs, such as CCAT1 and CCAT2, located at locus 8q24.21, are highly overexpressed in CRC (72). High expression of CCAT1 and CCAT2 is significantly associated with worse disease-free survival and overall survival than low expression of these markers. The expression levels of these two lncRNAs independently, or in combination, can be used as an important prognostic biomarker in CRC (73). In addition, CCAT1 in its long isoform also shows a positive relationship with tumor stage and progression (74).

CRNDE, an overexpressed lncRNA in colorectal adenomas and adenocarcinomas, can be a biomarker of early stages of disease because it is found in high concentrations in CRC compared to benign colorectal diseases (75). In addition, a variant described as exosomal CRNDE-h is detectable and stable in the serum of patients with CRC, so it can be used for diagnosis (76).

MALAT1 and HOTAIR are examples of dysregulated lncRNAs in most cancers (71). Overexpression of MALAT1 in tumor tissue has been particularly associated with lung cancer and colorectal cancer. The expression of MALAT1 in colorectal cancer tissue (stages II and III) correlates inversely and significantly with disease-free survival and overall survival, showing that patients with the highest levels of MALAT1 have the lowest 5-year overall survival durations (71).

HOTAIR, on the other hand, is considered more valuable as a prognostic biomarker than a diagnostic biomarker and is considered particularly valuable in the identification of metastatic potential (71). In fact, high levels of this lncRNA have been associated with poor survival outcomes for patients with colorectal cancer, who have a probable overall five-year survival of approximately 55%, compared with 80% in patients expressing lower levels of HOTAIR in tumor samples (71, 74).

Other lncRNAs can be used for diagnosis in the early stages of CRC, such as six exosomal lncRNAs (LNCV6_116109, LNCV6_98390, LNCV6_38772, LNCV_108266, LNCV6_84003 and LNCV6_98602) that were shown to be increased in samples of very early stage CRC compared with samples from healthy patients (77). Thus, lncRNAs are potential biomarkers for both early diagnosis and prognosis in CRC (77).

2. *CircRNA*

Circular RNAs (circRNAs) are a group of noncoding RNAs that have a range of lengths: they can be less than 100 or even more than 4000 nucleotides in length (31, 78, 79). CircRNAs act by binding microRNAs or other molecules as transcriptional or posttranscriptional regulators of gene expression (29, 79).

The structure of circRNAs is formed by closed loops through covalent bonds (29). They are considered cotranscriptional products since they arise from RNA back-splicing of exons and/or introns (29, 31, 79). Due to their formation mechanism, circRNAs have a different structure than linear RNAs, as they do not have 5' and 3' polarities or polyadenylated tails, making them more stable and less susceptible to enzymatic degradation (31, 80).

CircRNAs are divided into four different categories: exonic circRNAs (ecircRNAs), generated by exon back-splicing; intronic circRNAs (ciRNAs), synthesized from introns; exon-intron circRNAs (EIciRNAs), generated from exons and introns, simultaneously (29-31); and the recently discovered intergenic circRNAs, consisting of intronic fragments and GT-AC signals (30).

The functions of circRNAs are diverse, including functioning as competitive inhibitors of miRNAs, regulators of alternative splicing mechanisms, modulators of mRNA stability, and regulators of DNA transcription and protein translation (30, 31, 80).

In the case of cancer, circRNAs seems to play a role in the carcinogenesis of several tumors (76). Although the mechanisms by which circRNAs act are uncertain, studies have shown that there is dysregulation in the expression patterns of circRNAs and related genes in breast, cervical, stomach, colorectal and pancreatic cancer (76).

In tumors of the digestive system, circRNAs have been shown to be important regulators of tumor progression, having two important roles in cancer: onco-circRNAs and tumor suppressor circRNAs (81). Onco-circRNAs positively regulate tumor progression, acting on the expression of proteins (for example, BANP, E2F5, BAG4 and FMNL2), genes (for example, PVT1 and HIPK3) and microRNAs (81). Tumor suppressor circRNAs (or anti-oncogenic circRNAs) act through the negative regulation of carcinogenesis; for example, circ-104916 is found to have low expression in gastric cancer tissues but can be overexpressed when there is activation of inhibitory processes against the proliferation, migration and invasion of tumor cells (31, 81).

Regarding CRC, studies show a negative correlation between the amount of circRNA present in tumor cells and tissues and tumor proliferation (80). In line with this, it was discovered that there is a negative regulation of colorectal cancer cell lines that have a KRAS mutation by circRNAs, suggesting the possible utility of circRNAs as biomarkers in CRC with KRAS gene mutation (30, 82).

Another possible biomarker studied for CRC is hsa_circ_0000069, which is capable of inhibiting cell proliferation, cell migration and tissue invasion, in addition to inducing G0/G1 phase arrest during the cell cycle in vitro. This marker is significantly correlated with tumor differentiation and perineural invasion and can be used as a therapeutic or diagnostic target in colorectal cancer (80).

In relation to biomarkers, other circRNAs have been identified to play a role in colorectal cancer. As an example, hsa_circRNA_105055, hsa_circRNA_086376 and hsa_circRNA_102761 can be mentioned, which may be related to the presence of lung

metastases. There is also hsa_circ_0007534, which has been related to the tumor stage and lymph node metastasis, and circ-BANP, which originates from the BANP gene and seems to be related to cell proliferation (80). Thus, several studies corroborate the idea that circRNAs are promising biomarkers for colorectal cancer.

Conclusion

Given the current understanding of ncRNAs, it is possible to perceive the variety of functions they have as well as their potential as biomarkers for monitoring carcinogenic progression and predicting prognosis for both cancers in general and specifically CRC. However, translation into clinical practice is almost nonexistent, and the use of ncRNAs in routine management of cancer patients is not a reality. Therefore, further studies are needed to enable the inclusion of these biomarkers in the oncology management routine so that patients can benefit from their low cost and rapid test results.

Acknowledgements

CAPES Doctoral Scholarship; Oncológica do Brasil Ensino e Pesquisa; CNPQ Scholarship Scientific Initiation.

References

1. WHO. GCO. Cancer today: estimated number of new cases in 2018, worldwide, both sexes, all ages 2018 [cited 2019. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
2. Institute NC. Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer 2019 [cited 2019. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.
3. WHO. GCO, Cancer tomorrow: estimated number of incident cases from 2018 to 2040, colon, both sexes, all age 2019 [cited 2019. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.
4. Puccini A, Berger MD, Naseem M, Tokunaga R, Battaglin F, Cao S, et al. Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer*. 2017;1868(2):439-48.
5. Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, Garcia-Albeniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;109:9-19.
6. Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1).
7. Diamantopoulos MA, Tsiakanikas P, Scorilas A. Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. *Annals of translational medicine*. 2018;6(12):241.

8. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;937:3-17.
9. Lin C-P, He L. Noncoding RNAs in Cancer Development. *Annual Review of Cancer Biology*. 2017;1(1):163-84.
10. Zhang C, Huang D, Liu A, Xu Y, Na R, Xu DA-OhooX. Genome-wide screening and cohorts validation identifying novel lncRNAs as prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma. LID - 10.1002/jcb.29478 [doi]. 2019(1097-4644 (Electronic)).
11. Zhao KA-OhooX, Wang M, Kang H, Wu A. A prognostic five long-noncoding RNA signature for patients with rectal cancer. LID - 10.1002/jcb.29549 [doi]. 2019(1097-4644 (Electronic)).
12. Bakhtiyari S, Haghani K, Basati G, Karimfar MH. siRNA therapeutics in the treatment of diseases. *Therapeutic delivery*. 2013;4(1):45-57.
13. Zharikova A, Mironov A. piRNAs: biology and bioinformatics. *Molecular Biology*. 2016;50(1):69-76.
14. Ling H, Pickard K, Ivan C, Isella C, Ikuo M, Mitter R, et al. The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2016;65(6):977-89.
15. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;141(4):1202-7.
16. Muhammad S, Kaur K, Huang R, Zhang Q, Kaur P, Yazdani HO, et al. MicroRNAs in colorectal cancer: role in metastasis and clinical perspectives. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(45):17011.
17. Carter JV, Galbraith NJ, Yang D, Burton JF, Walker SP, Galandiuk S. Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*. 2017;116(6):762.
18. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA. *Cell*. 2013;153(3):516-9.
19. Nikam RR, Gore KR. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic acid therapeutics*. 2018;28(4):209-24.
20. Schütze N. siRNA technology. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;213(2):115-9.
21. Singh A, Trivedi P, Jain NK. Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(2):274-83.
22. Chalbatani GM, Dana H, Memari F, Gharagozlou E, Ashjaei S, Kheirandish P, et al. Biological function and molecular mechanism of piRNA in cancer. *Practical laboratory medicine*. 2018:e00113.
23. Liu Y, Dou M, Song X, Dong Y, Liu S, Liu H, et al. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Molecular cancer*. 2019;18(1):123.
24. Xing YH, Chen LL. Processing and roles of snoRNA-ended long noncoding RNAs. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2018;53(6):596-606.
25. Makarova JA, Ivanova SM, Tonevitsky AG, Grigoriev AI. New functions of small nucleolar RNAs. *Biochemistry Biokhimia*. 2013;78(6):638-50.
26. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*. 2013;10(6):925-33.
27. Chen LL. Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends in biochemical sciences*. 2016;41(9):761-72.
28. Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018;172(3):393-407.
29. Du WW, Zhang C, Yang W, Yong T, Awan FM, Yang BB. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. *Theranostics*. 2017;7(17):4183.

30. Meng S, Zhou H, Feng Z, Xu Z, Tang Y, Li P, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer. *Molecular cancer*. 2017;16(1):94.
31. Li R, Jiang J, Shi H, Qian H, Zhang X, Xu W. CircRNA: a rising star in gastric cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019:1-20.
32. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(9):597.
33. Tian T, Wang J, Zhou X. A review: microRNA detection methods. *Organic & biomolecular chemistry*. 2015;13(8):2226-38.
34. Maierthaler M, Benner A, Hoffmeister M, Surowy H, Jansen L, Knebel P, et al. Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2017;140(1):176-87.
35. Carvalho TId, Novais PC, Lizarte Neto FS, Sicchieri RD, Rosa MST, Carvalho CAMd, et al. Analysis of gene expression EGFR and KRAS, microRNA-21 and microRNA-203 in patients with colon and rectal cancer and correlation with clinical outcome and prognostic factors. *Acta cirurgica brasileira*. 2017;32(3):243-50.
36. Feiersinger F, Nolte E, Wach S, Rau TT, Vassos N, Geppert C, et al. MiRNA-21 expression decreases from primary tumors to liver metastases in colorectal carcinoma. *PloS one*. 2016;11(2).
37. Hansen T, Kjaer-Frifeldt S, Christensen R, Morgenthaler S, Blondal T, Lindebjerg J, et al. Redefining high-risk patients with stage II colon cancer by risk index and microRNA-21: results from a population-based cohort. *British journal of cancer*. 2014;111(7):1285-92.
38. Kulda V, Pesta M, Topolcan O, Liska V, Treska V, Sutnar A, et al. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010;200(2):154-60.
39. Chen J, Wang W, Zhang Y, Chen Y, Hu T. Predicting distant metastasis and chemoresistance using plasma miRNAs. *Medical oncology*. 2014;31(1):799.
40. Ma Y, Zhang P, Wang F, Zhang H, Yang J, Peng J, et al. miR-150 as a potential biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer. *Gut*. 2012;61(10):1447-53.
41. Hansen T, Carlsen A, Heegaard N, Sørensen FB, Jakobsen A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2015;112(4):624-9.
42. Hansen TF, Kjær-Frifeldt S, Morgenthaler S, Blondal T, Lindebjerg J, Jakobsen A, et al. The prognostic value of microRNA-126 and microvessel density in patients with stage II colon cancer: results from a population cohort. *Journal of translational medicine*. 2014;12(1):254.
43. Chen P, Xi Q, Wang Q, Wei P. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Medical Oncology*. 2014;31(10):235.
44. Qian J, Jiang B, Li M, Chen J, Fang M. Prognostic significance of microRNA-16 expression in human colorectal cancer. *World journal of surgery*. 2013;37(12):2944-9.
45. Menéndez P, Padilla D, Villarejo P, Palomino T, Nieto P, Menéndez JM, et al. Prognostic implications of serum microRNA-21 in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2013;108(6):369-73.
46. Chen Q, Xia H-W, Ge X-J, Zhang Y-C, Tang Q-L, Bi F. Serum miR-19a predicts resistance to FOLFOX chemotherapy in advanced colorectal cancer cases. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(12):7421-6.
47. Sarisozen C, Salzano G, Torchilin VP. Recent advances in siRNA delivery. *Biomolecular concepts*. 2015;6(5-6):321-41.

48. Wang T, Shigdar S, Al Shamaileh H, Gantier MP, Yin W, Xiang D, et al. Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. *Cancer letters*. 2017;387:77-83.
49. Yin Y, Cao L-Y, Wu W-Q, Li H, Jiang Y, Zhang H-F. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2010;16(9):1086.
50. Lee S-Y, Yang C-Y, Peng C-L, Wei M-F, Chen K-C, Yao C-J, et al. A theranostic micelleplex co-delivering SN-38 and VEGF siRNA for colorectal cancer therapy. *Biomaterials*. 2016;86:92-105.
51. Sadreddini S, Safaralizadeh R, Baradaran B, Aghebati-Maleki L, Hosseinpour-Feizi MA, Shanehbandi D, et al. Chitosan nanoparticles as a dual drug/siRNA delivery system for treatment of colorectal cancer. *Immunology letters*. 2017;181:79-86.
52. Seetharam RN, Sood A, Basu-Mallick A, Augenlicht LH, Mariadason JM, Goel S. Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells. *Anticancer research*. 2010;30(7):2531-8.
53. Peng H-x, Wu W-q, Yang D-m, Jing R, Li J, Zhou F-l, et al. Role of B7-H4 siRNA in proliferation, migration, and invasion of LOVO colorectal carcinoma cell line. *BioMed research international*. 2015;2015.
54. Lenart P, Novak J, Bienertova-Vasku J. PIWI-piRNA pathway: Setting the pace of aging by reducing DNA damage. *Mechanisms of ageing and development*. 2018;173:29-38.
55. Huang X, Tóth KF, Aravin AA. piRNA biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Trends in Genetics*. 2017;33(11):882-94.
56. Assumpcao CB, Calcagno DQ, Araújo TMT, Batista dos Santos SE, Ribeiro dos Santos AKC, Riggins GJ, et al. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer. *Epigenomics*. 2015;7(6):975-84.
57. Weng W, Li H, Goel A. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and cancer: Emerging biological concepts and potential clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2018.
58. Yan H, Wu Q, Sun C, Ai L, Deng J, Zhang L, et al. piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015;29(1):196.
59. Weng W, Liu N, Toiyama Y, Kusunoki M, Nagasaka T, Fujiwara T, et al. Novel evidence for a PIWI-interacting RNA (piRNA) as an oncogenic mediator of disease progression, and a potential prognostic biomarker in colorectal cancer. *Molecular cancer*. 2018;17(1):16.
60. Mai D, Ding P, Tan L, Zhang J, Pan Z, Bai R, et al. PIWI-interacting RNA-54265 is oncogenic and a potential therapeutic target in colorectal adenocarcinoma. *Theranostics*. 2018;8(19):5213.
61. Cao T, Rajasingh S, Samanta S, Dawn B, Bittel DC, Rajasingh J. Biology and clinical relevance of noncoding sno/scaRNAs. *Trends in cardiovascular medicine*. 2018;28(2):81-90.
62. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(3):209-20.
63. Stepanov GA, Filippova JA, Komissarov AB, Kuligina EV, Richter VA, Semenov DV. Regulatory role of small nucleolar RNAs in human diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:206849.
64. Thorenoor N, Slaby O. Small nucleolar RNAs functioning and potential roles in cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(1):41-53.
65. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(5):485-91.

66. Liu J, Wang J, Song Y, Yang Y, Hu Y, Gao P, et al. A potential biomarker for colorectal cancer: long non-coding RNA RP1-13P20.6. *Neoplasma*. 2016;63(6):984-90.
67. Okugawa Y, Toiyama Y, Toden S, Mitoma H, Nagasaka T, Tanaka K, et al. Clinical significance of SNORA42 as an oncogene and a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Gut*. 2017;66(1):107-17.
68. Yoshida K, Toden S, Weng W, Shigeyasu K, Miyoshi J, Turner J, et al. SNORA21 - An Oncogenic Small Nucleolar RNA, with a Prognostic Biomarker Potential in Human Colorectal Cancer. *EBioMedicine*. 2017;22:68-77.
69. Yang X, Li Y, Li L, Liu J, Wu M, Ye M. SnoRNAs are involved in the progression of ulcerative colitis and colorectal cancer. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2017;49(5):545-51.
70. Ferre F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction. *Briefings in bioinformatics*. 2016;17(1):106-16.
71. Silva A, Bullock M, Calin G. The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Cancers*. 2015;7(4):2169-82.
72. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Ruger R. Long Non-coding RNAs and their Role in Metastasis. *Cancer genomics & proteomics*. 2017;14(3):143-60.
73. Ozawa T, Matsuyama T, Toiyama Y, Takahashi N, Ishikawa T, Uetake H, et al. CCAT1 and CCAT2 long noncoding RNAs, located within the 8q.24.21 'gene desert', serve as important prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(8):1882-8.
74. Smolle M, Uranitsch S, Gerger A, Pichler M, Haybaeck J. Current status of long non-coding RNAs in human cancer with specific focus on colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(8):13993-4013.
75. Kim T, Croce CM. Long noncoding RNAs: Undeciphered cellular codes encrypting keys of colorectal cancer pathogenesis. *Cancer Lett*. 2018;417:89-95.
76. Liu T, Zhang X, Gao S, Jing F, Yang Y, Du L, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(51).
77. Hu D, Zhan Y, Zhu K, Bai M, Han J, Si Y, et al. Plasma Exosomal Long Non-Coding RNAs Serve as Biomarkers for Early Detection of Colorectal Cancer. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;51(6):2704-15.
78. Huang C, Shan G. What happens at or after transcription: insights into circRNA biogenesis and function. *Transcription*. 2015;6(4):61-4.
79. Jiang L-h, Sun D-w, Hou J-c, Ji Z-l. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer. *Breast cancer*. 2018;25(1):1-7.
80. Yin Y, Long J, He Q, Li Y, Liao Y, He P, et al. Emerging roles of circRNA in formation and progression of cancer. *Journal of Cancer*. 2019;10(21):5015.
81. Sun Z, Chen C, Su Y, Wang W, Yang S, Zhou Q, et al. Regulatory mechanisms and clinical perspectives of circRNA in digestive system neoplasms. *Journal of Cancer*. 2019;10(13):2885-91.
82. Dou Y, Cha DJ, Franklin JL, Higginbotham JN, Jeppesen DK, Weaver AM, et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. *Scientific reports*. 2016;6:37982.

4.2 Capítulo 2 - Associação da expressão de miRNA e prognóstico em pacientes com câncer colorretal: uma revisão sistemática

Resumo

Introdução: Em indivíduos com doenças crônicas, como câncer colorretal, os estudos de expressão de miRNA têm sido focados em resistência medicamentosa e biomarcadores prognósticos. No entanto, as evidências sobre essa associação não foram sintetizadas, impossibilitando o processo de tradução. Assim, apresentamos um protocolo para uma revisão sistemática da associação entre expressão de miRNA e fatores prognósticos em indivíduos com câncer colorretal. **Método:** Esta revisão sistemática considera as diretrizes PRISMA e o Cochrane Handbook for Systematic Reviews. Foram realizadas buscas em seis bases de dados eletrônicas (Medline, Scopus, Web of Science, Cochrane Clinical Trials e Embase) e repositórios especializados. Foram incluídos estudos publicados em revistas especializadas se atendessem aos seguintes critérios de elegibilidade: 1) avaliar indivíduos com câncer colorretal (> 18 anos); 2) expressão de miRNA como exposição; 3) resultados relacionados a tumores (por exemplo, proliferação celular e invasão tecidual), pacientes (por exemplo, reações adversas/toxicidade, resistência a medicamentos, resposta a medicamentos, estágio TNM e localização do tumor) e prognósticos (sobrevida global e sobrevivida livre de doença); e 4) ensaios clínicos, estudos longitudinais de coorte ou caso-controle. Os processos de seleção dos estudos, extração de dados e avaliação/síntese foram realizados em duplicata. Características do estudo, participantes, intervenções e resultados foram extraídas e descritas. A avaliação do risco de viés foi realizada usando a ferramenta QUIPs para estudos de coorte e caso-controle. A síntese de evidências incluirá a avaliação do nível de evidência com base na abordagem GRADE e meta-análise da associação entre miRNAs e resultados disponíveis com base nas diretrizes Cochrane. **Discussão:** Esperamos que esta revisão leve a melhorias metodológicas em futuras pesquisas e práticas clínicas, ajudando assim a entender melhor a associação entre tipos de miRNA e diferentes fatores prognósticos em indivíduos com câncer colorretal.

Registro da Revisão Sistemática: PROSPERO CRD42017080872

Palavras-chave: câncer colorretal, microRNAs, prognóstico.

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é um grave problema de saúde em todo o mundo. Estima-se que o CCR represente aproximadamente 8% de todos os cânceres nos Estados Unidos¹, afetando principalmente homens (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017; SUNG *et al.*, 2021). Segundo dados dos EUA em 2017, o percentual de doença localizada de câncer colorretal ao diagnóstico é de 39%, enquanto o percentual de doença metastática é de 14%, e outra parte é uma doença de progressão local (ARNOLD *et al.*, 2017). Atualmente, outras classificações baseadas em critérios genéticos e moleculares também estão sendo usados para esse tipo de câncer (CANCER GENOME ATLAS, 2018; DIENSTMANN *et al.*, 2017). Essas novas classificações distinguem CCRs como CMS1, CMS2, CMS3 or CMS4 (consensus molecular subtypes – CMS) (DIENSTMANN *et al.*, 2017).

Outras avaliações baseadas no DNA e modificações epigenéticas, como fatores moleculares (por exemplo, metilação) e expressão de miRNA, também têm sido estudadas na tentativa de avaliar novos biomarcadores que possam prever resultados ou prognósticos do CCR (LAM *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2015). Os biomarcadores são utilizados na avaliação das características tumorais e do quadro clínico de cada paciente (STINTZING *et al.*, 2015; ERSTAD; TUMUSIIME; CUSACK, 2015). Esses biomarcadores podem prever diferentes prognósticos e determinar diferentes respostas aos tratamentos (SUNG *et al.*, 2021; STINTZING *et al.*, 2015; VALIHRACH; ANDROVIC; KUBISTA, 2019). Biomarcadores prognósticos também podem ser estabelecidos para determinar prognósticos com diferentes impactos na sobrevida global e livre de doença, como relacionados ao tumor (proliferação celular, invasão tecidual, movimento celular e angiogênese) e fatores relacionados ao paciente (reações adversas/toxicidade, resistência ao medicamento, resposta ao medicamento, estágio TNM [metástase da neoplasia, metástase do linfonodo e tamanho do tumor] e localização do tumor). Além disso, marcadores preditivos podem determinar qual medicação é preferível para tratamento com base no status do marcador (SUNG *et al.*, 2021; STINTZING *et al.*, 2015). Esses mecanismos podem explicar a razão pela qual os miRNAs se comportam como fatores prognósticos e preditivos.

Mais especificamente, os miRNAs são RNAs não codificantes de até 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica após a transcrição (HAMMOND, 2015). Os miRNAs podem ter grande significância no câncer quando ligados à expressão de oncogenes, genes supressores de tumor e respostas específicas à medicação (AMIRKHAH *et al.*, 2015; HUMMEL; HUSSEY; HAIER, 2010). No CCR, os miRNAs são estudados por seus papéis no prognóstico

da doença, determinação da resistência à medicação, e até mesmo como preditores de tratamento e biomarcadores para prognósticos específicos, dependendo de sua expressão nos pacientes (HUMMEL; HUSSEY; HAIER, 2010; WANG, 2020). As associações entre miRNAs e fatores prognósticos têm sido, portanto, consideradas em estudos clínicos de CCR. Por exemplo, o has-miR-1 e o has-miR-18a têm impactos no prognóstico do paciente com CCR quando são subexpressos e superexpressos, respectivamente (WANG, 2020). No entanto, devido às diferenças nos desenhos dos estudos, populações-alvo e falta de avaliações da qualidade metodológica e níveis de evidência, o processo de tradução desses resultados para a prática clínica se torna questionável (TIBERIO *et al.*, 2015). Além disso, revisões sistemáticas abordando temas semelhantes avaliam a expressão específica de miRNAs, como em biópsias líquidas, ou avaliando miRNAs isolados ou resultados prognósticos únicos (TOIYAMA *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2018; GUN *et al.*, 2018; MOHER *et al.*, 2009). Assim, uma avaliação robusta de quais dados disponíveis pode ser aplicada a pacientes com câncer colorretal.

Portanto, este estudo tem como objetivo apresentar uma revisão sistemática que busca sintetizar e avaliar evidências da associação entre expressão de miRNA e fatores prognósticos em indivíduos com câncer colorretal. Neste contexto, será avaliada a expressão de miRNAs ligados a oncogenes, genes supressores de tumor e outros genes. Além disso, fatores prognósticos ligados a tumores (proliferação celular, invasão tecidual, movimento celular e angiogênese), pacientes (reações adversas/toxicidade, resposta ao medicamento, estágio TNM, metástase no nódulo tumoral, localização do tumor) e prognósticos (sobrevida geral e sobrevivida livre de doença) em pacientes com câncer colorretal também foi considerada.

Método e Desenho

Problema/Pergunta

1. A hiperexpressão / hiperexpressão de miRNAs foi associada a fatores prognósticos relacionados a tumor, pacientes e principais resultados prognósticos?

Objetivos, desenho, e planejamento do estudo

Esta revisão sistemática busca sintetizar e avaliar evidências da associação entre expressão de miRNA e fatores prognósticos em indivíduos com câncer colorretal.

Este estudo foi baseado no Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)¹⁹, bem como no Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions²⁰

Este protocolo foi registrado no International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (Registration number: CRD 42017080872).

Característica dos participantes ou descrição dos materiais

Identificação dos estudos elegíveis

Os estudos foram incluídos caso fossem publicados em periódicos especializados, atendessem aos seguintes critérios de elegibilidade e fossem organizados por população, intervenção, controle, resultado e desenho do estudo (estrutura PICOS) (THOMAS *et al.*, 2015; HUANG; LIN; DEMNER-FUSHMAN, 2006).

Participantes

Foram incluídos estudos com amostra composta por sujeitos de ambos os sexos, maiores de 18 anos com diagnóstico de câncer colorretal, independente do tempo de diagnóstico. Estudos com linhagens celulares que incluam animais não serão considerados.

Intervenção/Exposição

Esta revisão considerou a expressão de miRNA como 1) superexpressiva, quando a expressão é maior que o normal, 2) subexpressa, quando a expressão é menor que o normal ou 3) normalmente expressa (HAMMOND, 2015). Assim, estudos elegíveis avaliarão miRNAs considerando diversos líquidos ou tecidos, como sangue e tecidos tumorais (WANG, 2020). Para mais, técnicas que envolvem plataformas usando microarray, reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e processos de hibridização base-base, bem como sequenciamento de próxima geração (NGS), também foram elegíveis (HAMMOND, 2015).

Tipos de estudos

Foram incluídos ensaios clínicos randomizados (ECRs) que atendessem aos seguintes critérios: ter pelo menos um grupo de intervenção que modifique diretamente a expressão de miRNAs ou a aplicação direta de miRNAs nos participantes, bem como um grupo controle de qualquer outra intervenção ou intervenção de acompanhamento. Além disso, foram incluídos estudos de caso de corte e controle que mostram exposição a qualquer tipo de miRNA, independentemente do tempo de acompanhamento ou direção do estudo (retrospectivo ou

prospectivo para estudos de coorte). Estudos observacionais transversais não foram incluídos devido à possibilidade de avaliação prognóstica nesses tipos de estudos. Os estudos foram pesquisados periódicos especializados, literatura cinzenta e bancos de dados de repositórios,

Os estudos foram incluídos independentemente do status de publicação (periódicos científicos com revisão por pares ou outros tipos). O idioma de publicação foi considerado fator limitante, foi aceito apenas o inglês.

Resultados

Os resultados incluídos foram selecionados de acordo com os principais desfechos prognósticos estabelecidos pela Food and Drug Administration (FDA), bem como por meio de avaliações de revisões adicionais no tema incluindo sobrevida global e sobrevida livre de doença e avaliações de artigos de revisão de literatura para a determinação de fatores prognósticos relacionados ao câncer colorretal (STINTZING *et al.*, 2015; THOMAS *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015; WANG, 2020; DENG, 2017; KIM, 2017). A partir dessas análises, serão incluídos os estudos que apresentarem os seguintes resultados como fatores prognósticos:

Relacionado ao Tumor

Proliferação celular

Invasão tecidual

Movimento celular

Angiogênese

Relacionado ao Paciente

Reações adversas/toxicidade

Resistência medicamentosa

Resposta ao medicamento

Estágio TNM (metástase de neoplasia, metástase de linfonodo e tamanho do tumor)

Localização do tumor

Principais resultados prognósticos

Sobrevida global

Sobrevida livre de doença

Estratégia de Busca

Uma busca eletrônica de cinco bases de dados foi realizada para identificar as publicações que atendem aos critérios de seleção. A busca será realizada sem limites à data ou idioma de publicação.

As palavras-chave a serem usadas foram selecionadas de acordo com Medical Subject Headings (MeSH) na National Library of Medicine e palavras de texto usadas em estudos bioquímicos sobre expressão de miRNA.

A organização dos termos para a busca será realizada de acordo com a estratégia PICOS. Para sensibilizar a busca de artigos, a estratégia para cada base de dados é descrita a seguir:

1. Medline (Conteúdo Digital Complementar 2): usado com os termos MeSH e todos os *entry terms*;
2. Scopus (Conteúdo Digital Complementar 3);
3. Web of Science (Conteúdo Digital Complementar 4);
4. Cochrane (Conteúdo Digital Complementar 5);
5. EMBASE (Conteúdo Digital Complementar 6).

Além das pesquisas de banco de dados, as seguintes estratégias de pesquisa serão empregadas:

i. *Pesquisas em repositórios de ensaios clínicos e pesquisas sobre o câncer*: Também consultaremos os registros de Ensaios Clínicos dos EUA (<http://clinicaltrials.gov/>) e do Brasil (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>). O repositório de pesquisa do câncer (<https://www.unmc.edu/cancercenter/registry/>) também será usado.

Registros do Estudo

Gestão de dados

O gerenciamento de referências e remoção de duplicatas foi realizado com o EndnoteX7, e os artigos serão gerenciados usando planilhas Excel e software Review Manager (RevMan) (<http://community.cochrane.org/tools/review-production-tools/revman-5>). A estratégia de busca foi realizada em maio de 2018 e atualizada em janeiro de 2019.

Processo de seleção

Concluídas as buscas nas bases de dados propostas, foi criada uma única biblioteca e as duplicatas foram removidas. Após esse processo, dois revisores selecionaram os artigos de forma independente. Além disso, foram criadas referências para todos os artigos, e os motivos da exclusão dos artigos foram justificados.

Havia dois níveis do processo de seleção. No primeiro nível, os revisores avaliaram os artigos por meio da leitura de títulos e resumos. No segundo nível de seleção, os revisores fazem a leitura dos textos completos. Nesta etapa, os revisores devem avaliar os critérios de inclusão. As exclusões devem ser justificadas na planilha.

Em cada uma das duas etapas, foi realizada uma reunião de consenso para analisar quais artigos foram considerados elegíveis para revisão. Se necessário, um terceiro revisor também foi consultado para resolver discordâncias.

Os autores utilizaram o programa EndnoteX7 para gerenciar as referências. As listas de referência dos estudos incluídos foram pesquisadas independentemente por um revisor para identificar estudos potenciais adicionais.

Análise estatística e síntese do estudo

Processo de coleta de dados

Todas as fases de extração de dados, gerenciamento, risco de viés, nível de evidência e síntese foram realizadas por dois revisores, e um terceiro revisor resolveu as discordâncias.

Extração de dados

Os revisores receberam a planilha (elaborada por JSS) em Excel com todas as variáveis a serem preenchidas. Resultados descritivos relativos às características do estudo (tipo de estudo, país e contexto), características da população (número de participantes, faixa etária, condição clínica específica, critérios de elegibilidade e método de seleção da amostra), exposições (miRNAs, expressão de miRNA, classificação de expressão de miRNA, genes, tipos de genes relacionados à carcinogênese), fatores prognósticos (tipo de fator, tipo avaliável) e resultados do estudo foram apresentados.

Risco de viés e qualidade metodológica de estudos individuais

Para reduzir vieses sistemáticos e erros inferenciais nos resultados de interesse, avaliamos o risco de viés dos estudos de acordo com QUIPs Tool (TANG *et al.*, 2018). Dois pesquisadores estiveram envolvidos no processo de avaliação dos artigos. Inicialmente, o autor principal JSS avaliou os estudos individual, após reunião de consenso (JSS e VF) ajustaram os parâmetros de escolha e avaliação dos domínios e formatos de avaliação dos estudos de forma total.

Na avaliação do risco de viés global para cada estudo foram utilizados os seguintes domínios: Study participation, Prognostic Measure, Outcome Measure, Study confuding e statistical analysis and reporting. O domínio study attrition não foi considerada na avaliação dos estudos incluídos pois não representava características identificáveis na maior parte dos estudos, não sendo julgada como determinante para o risco de viés dos estudos incluídos, conforme orientação do Quips Tool. Dessa forma, para cada estudo foi avaliado se qualquer um dos sub-domínios acima fosse classificado como alto risco de viés, a categoria era denominada com esta classificação, o mesmo ocorrendo para moderado risco de viés. A categoria somente era determinada com baixo risco de viés, caso apresentasse em todos os seus sub-domínios a classificação de baixo risco de viés. Da mesma forma, foi avaliado o risco de viés global dos estudos. Os estudos que apresentassem em todos os domínios baixo risco de viés, eram classificados dessa forma. Caso apresentassem pelo menos 1 domínio como moderado ou alto risco de viés, eram assim classificados.

Síntese dos dados

A decisão sobre a síntese quantitativa dos estudos incluídos (metanálise sobre a influência dos miRNAs nos resultados disponíveis) foi realizada em reunião por consenso com os autores, considerando questões clínicas e estatísticas de homogeneidade.

Contudo, quando avaliamos os diferentes elementos (PICOS) que aproximassem os estudos em questões clinicamente homogêneas), e levando em consideração somente aqueles estudos com baixo ou moderado risco de viés, não foi possível determinar um subconjunto destes que pudessem ser agrupados de maneira quantitativa. Por exemplo, dois estudos que mais se aproximavam neste sentido: HENSEN *et al* 2014 e JEPSEN *et al* 2016 apresentavam estadiamento clínicos diferentes, fator determinante para sobrevida global, não podendo ser assim agrupados. Therefore, we decided to present the results in a narrative synthesis.

A síntese narrativa foi realizada segundo a estratégia PICOS levando em consideração: autor; data da publicação; tipo de estudo; características da população – idade, estadiamento, país do estudo; miRNAs avaliados; desfechos prognósticos avaliados.

Além disso, para todas as análises foram realizadas a avaliação pelos subgrupos de tipos de estudos. A síntese narrativa, avaliação de viés e tomada de decisão para realização de meta-análise com base na padronização entre os estudos com foco nos de moderado e baixo risco de viés.

Na análise de subgrupo por tipo de estudo (Coorte, Caso Controle e Ensaio Clínicos) foi avaliado o risco de viés de cada estudo, deixando-se somente para seguimento de análise os de moderado e baixo risco. Em seguida foram avaliadas as características clínicas dos indivíduos, miRNAs avaliados e os desfechos prognóstico. Optou-se pela não realização de meta-análise devido a não homogeneidade clínica entre os estudos levando em consideração os parâmetros acima. Em nossa descrição narrativa foi relacionado todos os impactos dos miRNAs individualmente em cada desfecho prognóstico avaliado por estudo.

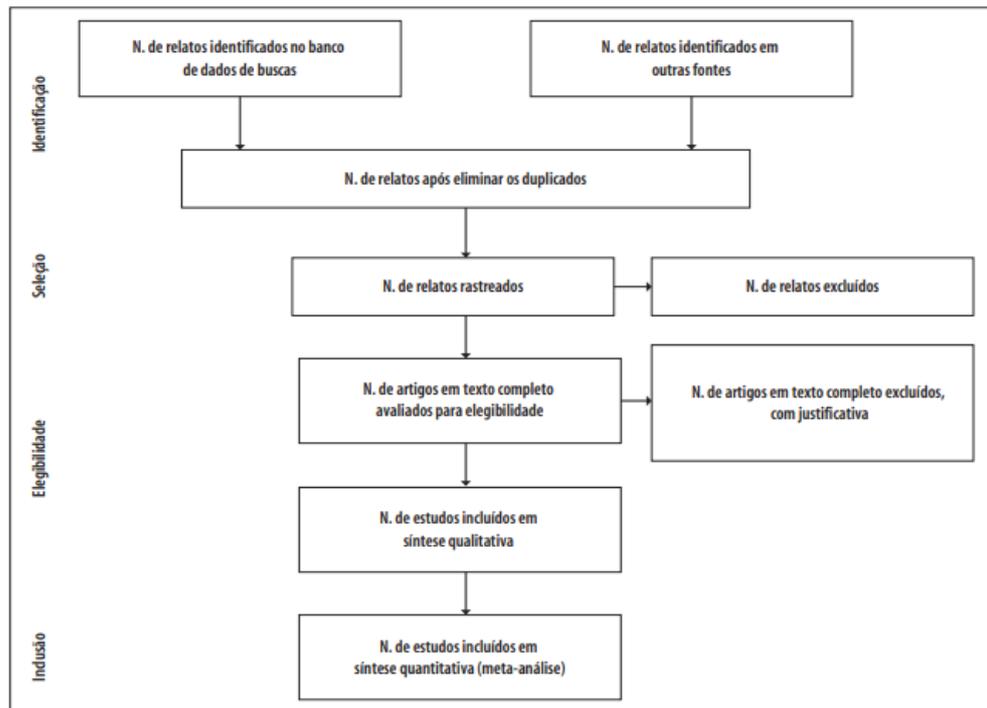
Os estudos foram apresentados em ordem alfabética de autor principal, em ordem cronológica por ano de publicação, por tipo de estudo ou em alguns subgrupos com base na análise de subgrupos.

RESULTADOS

Busca, Seleção e Extração

Na fase de busca conforme método indicado foi possível avaliar a seguinte composição dos artigos: Medline (Pubmed) 135 artigos; Scopus 323 artigos; Web of Science 24 artigos; EMBASE 94 artigos; e Cochrane Clinical Trials 11 artigos selecionados. Dessa forma, 587 artigos foram inicialmente obtidos, além disso foram incluídos mais 3 de outras fontes, totalizando 590 artigos. Após a remoção de duplicatas, restaram 469 artigos. Durante o processo de seleção por títulos e resumos, 186 artigos foram excluídos. Após isso, 221 artigos foram excluídos após leitura integral. Os processos descritos para seleção. Ao final, 62 artigos foram incluídos para extração dos dados (Figura 6).

Figura 6 – Processo de desenvolvimento da pesquisa de acordo com diretrizes PRISMA.



Fonte: Adaptado e traduzido de PRISMA 2020

A maioria dos artigos que compõem esta revisão são do tipo coorte ($n= 53$; 85,5%), sendo que a maior parte deles ($n=21$; 33,33%) avaliou pacientes nos estágios I, II, III e IV da doença; 25,38% ($n=16$) avaliou pacientes em estágio IV; 6,34% ($n=4$) em estágio III e 9,52% ($n=6$) o estágio 2. Os estudos estiveram concentrados entre os continentes Europeus e Asiáticos, ambos com 20 estudos cada (Figura 7).

Figura 7 – Distribuição dos estudos por continente



Fonte: Dados de análise interna

Análise de Risco de Viés

Na avaliação do risco de viés global de cada estudo incluído por meio do Quips Tool foi possível avaliar que 22 (34,5%) estudos tiveram alto risco de viés, 29 (46,8%) estudos tiveram risco de viés moderado e 11 (17,7%) estudos apresentaram baixo risco de viés. Quando avaliamos somente os de baixo risco de viés, oito (08) artigos estavam categorizados como coorte e 3 como ensaios clínicos. Entre os estudos de caso controle, todos apresentavam moderado risco de viés e publicados pelo mesmo autor, SLATERY *et al.* Além disso, na avaliação por domínios do Quips tool, o domínio Study confounding apresentou maior número de estudos com alto risco de viés (Coorte – 13; Caso Ensaio Clínicos -2), seguido do domínio Study participation (Coorte – 8; Ensaio Clínicos – 2). Os domínios Prognostic measure e outcome measures não apresentaram nenhum estudo com alto risco de viés, sendo que este último apresentou praticamente todos os estudos com baixo risco de viés, sendo somente 1 estudo no subgrupo de ensaios clínicos com moderado risco de viés. A avaliação do risco de viés global por estudo encontra-se na Tabela 3 das características gerais dos estudos.

Exposição

Observa-se que miR-21 foi o mais citado (17 artigos) nos artigos selecionados para esta revisão sistemática, seguidos do miR-126 (7 artigos), miR-143 (6 artigos) e miR-155 (5 artigos), todos os miRNAs avaliados encontram-se na tabela 3. A maioria dos artigos utilizou tecido tumoral e sangue para avaliar a presença do miRNA de interesse, sendo o método de análise mais citado o PCR.

Sendo que para o miR-21 houve impacto da hiperexpressão do miRNA no prognóstico dos pacientes, inclusive com diminuição da sobrevida global em pacientes estádios IV (2) e estágio II (3). Outcomes and clinical implications

Tabela 3 – Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações

(continua)

miRNA	Fr (n estudos)	Estudos	Desfecho
miR-21	17	Almeida et al (2016); Bovell et al (2013); Bullock et al (2015); Carvalho et al (2017); Chegn et al (2011); Feiersinger et al (2016); Hansen et al (2014); Jepsen et al (2016); Kulda et al (2010); Li et al (2015); Menendez et al (2013); Mima et al (2016); Schee et al (2012); Tanoglu et al (2015); Vinicius et al (2013); Yazdani et al (2016); Mekenkamp et al (2012)	OS/ DFS/ PFS/ Estadiamento/ Recorrência em 5 anos/ Remissão de doença e morte/Recorrência/Risco de metástase linfonodal/ Mortalidade Específica por câncer/MFS/ Diferenciação/ Infiltração de linfócitos/ Invasão vascular/invasão perineural/ crescimento perinodal/Resposta ao tratamento/ Tamanho do tumor
mir-126	7	Almeida et al (2016); Hansen et al (2015); Hansen et al (2014); Hansen et al (2014); Hansen et al (2012); Hansen et al (2013); Kjersema et al (2014);	OS/ PFS/ Resposta RECIST/RF-CSS/ Taxa de resposta
miR-143	6	kulda et al (2010); Pichler et al (2012); Ristau et al (2014); Tanoglu et al (2015); Mekenkamp et al (2012); Schou et al (2014)	OS/Estadiamento/PFS/RF-CSS/ Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/ DFS
miR-155	5	Monzo et al (2017); Tanoglu et al (2015); Chen et al (2014); Mekenkamp et al (2012); Chen et al (2014)	PFS/ Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/Estadiamento/ OS/ Metástase/ resposta a quimioterapia

Tabela 3 - Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações

(continuação)

miRNA	Fr (n estudos)	Estudos	Desfecho
miR-200c	5	Jepsen et al (2016); Li et al (2015); Tanoglu et al (2015); Toiyama et al (2014); Chen et al (2014)	OS/ Risco de metástase linfonodal/ DFS/ Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/ Metástase/ Resposta a quimioterapia

miR-106a	4	Bovell et al (2013); Schee et al (2012); Tanoglu et al (2015); Yu et al (2012)	MFS/ Estadiamento/ Diferenciação/ Localização do tumor/ Infiltração de linfócitos/ Invasão vascular/ Invasão perineural/ Crescimento perinodal/ Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/ OS
miR-92a	4	Jepsen et al (2016); Li et al (2015); Schee et al (2012); Yu et al (2012)	OS/ Risco de metástase linfonodal/DFS/ MFS/ Estadiamento/ Diferenciação/ Localização do tumor/ Infiltração de linfócitos/ Invasão vascular/ Invasão perineural/ Crescimento perinodal/
miR-133a	3	Tanoglu et al (2015); Wan et al (2014); Mekenkamp et al (2012)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/ OS/Estadiamento/ PFS
miR-20a	2	Bovell et al (2013); Yu et al (2012)	OS/Estadiamento
miR-200b	3	Maierthaler et al (2016); Toiyama et al (2014); Mekenkamp et al (2012)	OS/ DFS/ Metástase Linfonodal/ PFS
miR-215	3	Bullock et al (2015); Svoboda et al (2012); Slattery et al (2014);	Recorrência em 5 anos/ Resposta ao tratamento/ OS/ Estadiamento
miR-19a	4	Bullock et al (2015); Chen et al (2013); Mekenkamp et al (2012); Yu et al (2012)	Recorrência em 5 anos/ OS/ PFS/
let-7a	2	Ruzzo et al (2012); Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS/ Número de Metástases
miR-133b	2	Tanoglu et al (2015); Mekenkamp et al (2012)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/ OS/PFS
miR-141	2	Toiyama et al (2014); Chegn et al (2011)	OS/DFS/ Metástase Linfonodal
miR-145	2	Schee et al (2012); Tanoglu et al (2015);	MFS/ Estadiamento/ Diferenciação/ Localização do tumor/ Infiltração de linfócitos/ Invasão vascular/ Invasão perineural/ Crescimento perinodal/ Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor
miR-181a	2	Pichler et al (2014); Mekenkamp et al (2012)	PFS/ RF-CSS/ OS

Tabela 3 - Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações

(continuação)

miRNA	Fr (n estudos)	Estudos	Desfecho
miR-203	2	Bovell et al (2013); Carvalho et al (2017)	OS/ Estadiamento/ TNM/ Remissão de doença e morte/recorrência

miR-224	2	Ling et al (2016); Adamopoulos et al (2015)	OS/ Metástase/DFS
miR-31-5p	2	Slattery et al (2014); Kiss et al (2016)	OS/ Estadiamento/ PFS
miR-34a	2	Almeida et al (2016); Schou et al (2014);	OS/ Estadiamento/ DFS
miR-429	2	Toiyama et al (2014); Sun et al (2014);	OS/DFS/ Metástase Linfonodal/ Estadiamento
mir-17	1	Yu et al (2012)	OS
miR-182	2	Tanoglu et al (2015); Wang et al (2014)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor/ OS
miR-99a	2	Cappuzzo et at (2014); Svoboda et al (2012)	OS/PFS/ Resposta ao tratamento
miR-18a	1	Yu et al (2012)	OS
miR-19b	2	Mekenkamp et al (2012); Yu et al (2012)	OS/PFS
miR-29b	2	Basati et al (2015); Svoboda et al (2012)	Resposta ao tratamento/ OS/ Estadiamento
miR-32	2	ozawa et al (2017); Wu et al (2013)	Risco de metástase linfonodal/
miR-122	2	Chen et al (2013); Maierthaler et al (2016)	Resistência/OS/PFS
cel-miR-39	1	Toiyama et al (2014)	OS/DFS/ Metástase Linfonodal
let-7a-5p	1	Liu et al (2016)	OS/Risco de metástase linfonodal

Tabela 3 - Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações

(continuação)

miRNA	Fr (n estudos)	Estudos	Desfecho
Let-7c	1	Cappuzzo et at (2014)	OS/PFS

let-7g	1	Monzo et al (2017)	PFS
miR-100	1	Chen et al (2014)	Recorrência/ Metástase/Resposta a quimioterapia
miR-101	1	Schee et al (2012)	MFS/ Estadiamento/ Diferenciação/ Localização do tumor/ Infiltração de linfócitos/ Invasão vascular/ Invasão perineural/ Crescimento perinodal
miR-105	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-125b	1	Cappuzzo et al (2014)	OS/PFS
miR-127	1	Tanoglu et al (2015)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor
miR-144	1	Chen et al (2013)	Resistência
miR-145-5p	1	Slattery et al (2014)	OS/Estadiamento
miR-15	1	Kjersema et al (2014)	PFS
miR-15b	1	Monzo et al (2017)	PFS
miR-16	1	Qian et al (2013)	OS/Estadiamento
miR-181b	1	Bovell et al (2013)	OS/ Estadiamento
miR-181b-1	1	Ozawa et al (2017)	Risco de metástase linfonodal
miR-192	1	Bullock et al (2015)	Recorrência em 5 anos

Tabela 3 - Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações

(continuação)

miRNA	Fr (n estudos)	Estudos	Desfecho
miR-194	1	Bullock et al (2015); Basati et al (2015)	Recorrência em 5 anos/OS

miR-200a	1	Tanoglu et al (2015)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor
miR-200b-3p	1	Slattery et al (2014)	OS/Estadiamento
miR-204-5p	1	Sumbul et al (2014)	OS
miR-211	1	Sumbul et al (2015)	OS/ Invasão de parede/ Metastase linfonodal/ Invasão vascular/ Invasão perineural/ Metástase hepática
miR-217	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-221	1	Chen et al (2013)	Resistência
miR-222	1	Chen et al (2013)	Resistência
miR-24	1	Kjersema et al (2014)	PFS
miR-346	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-27a	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-27b	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-30a	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-30d	1	Tanoglu et al (2015)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor
miR-31	1	Tanoglu et al (2015)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor

Tabela 3 - Avaliação da frequência absoluta de estudos que citam os miRNAs em suas avaliações

(conclusão)

miRNA	Fr (n estudos)	Estudos	Desfecho
miR-324-3p	1	Schou et al (2014)	OS/DFS

miR-328	1	Monzo et al (2017)	PFS
miR-345	1	Schou et al (2014)	OS/DFS
miR-362-3p	1	Tanoglu et al (2015)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor
miR-451a	1	Slattery et al (2014)	OS/Estadiamento
miR-455-5p	1	Boisen et al (2014)	OS/Progressão de doença
miR-619-5p	1	Qiu et al (2016)	OS/DFS/Estadiamento
miR-628-5p	1	Schou et al (2014)	OS/DFS
miR-630	1	Milino et al (2017)	Resposta a quimioterapia
miR-664-3p	1	Boisen et al (2014)	OS/Progressão de doença
miR-7	1	Milino et al (2017)	Resposta a quimioterapia
miR-886-3p	1	Schou et al (2014)	OS/DFS
miR-9	1	Tanoglu et al (2015)	Resposta ao tratamento/Recorrência do tumor
miR-92	1	Chegn et al (2011)	OS
miR-96	1	Mekenkamp et al (2012)	OS/PFS
miR-139-3p	1	Liu et al (2014)	OS

Quando analisamos o desfecho mais descrito, observa-se que a sobrevida global foi o mais abordado, seguida do estadiamento. Do total de 59 miRNA avaliados, 23 não apresentaram relação com os prognósticos avaliados. Os que apresentaram relação com os prognósticos. A avaliação dos impactos individuais de cada estudo e os miRNAs está disponível na tabela 3.

O miR-21, principal miRNA citado nos estudos, quando hiperexpresso apresenta impacto deletério no prognóstico dos pacientes. Assim, apresenta diminuição da sobrevida global em white pacientes estádios IV (2) (H HR 1/4 2.50; 95% CI, 1.07–5.83) e paciente com estágio II (3) (OS: HR = 2.47, $p = 0.029$), diminuição da sobrevida livre de recorrência (14) (hazard ratio 1.35 (95% confidence interval, 1.03–1.76) (P 1/4 0.028).

Para o miR-126, a diminuição da expressão apresentou relação com uma melhor resposta ao tratamento com Bevacizumab em pacientes com CRC metastático -0.374 (95% CI, 0.472 to 0.111) in the responding patients, P 1/4 0.002) quando comparado aos que tiveram aumento da expressão 0.244 (95% confidence interval (CI), 0.050–0.565). Ainda para o miR-126 houve melhor PFS dos pacientes metastáticos em uso de XELOX em primeira linha que apresentaram hiperexpressão (11.5 months 95% CI, 9.0-12.7 months) do miRNA, quando parados aos hipoexpressos (6.0 months (95% CI, 4.8-6.9 months – $p < 0.0001$).

Para o miR-200c, a maioria dos estudos avaliados, não apresentou impacto destes miRNA nos prognósticos dos pacientes. Os estudos que tiveram impactos significativos, mostram que o aumento da expressão pode estar ligado a pior prognóstico (HR=4.51, 95% CI=1.56–13.01 $P=0.005$) (HUANG; LIN; DEMNER-FUSHMAN, 2006; ZHENG *et al.*, 2015)

A avaliação dos impactos individuais de cada estudo e os miRNAs está disponível na tabela 3. A maioria dos artigos utilizou tecido tumoral e sangue para avaliar a presença do miRNA de interesse, sendo o método de análise mais citado o PCR. Quando analisamos o desfecho mais descrito, observa-se que a sobrevida global foi o mais abordado, seguida do estadiamento.

Análise de Risco de Viés

Na avaliação do risco de viés global de cada estudo incluído por meio do Quips Tool foi possível avaliar que 22 (34,5%) estudos tiveram alto risco de viés, 29 (46,8%) estudos tiveram risco de viés moderado e 11 (17,7%) estudos apresentaram baixo risco de viés. Dentre os estudos com baixo risco de viés. Quando avaliamos somente os de baixo risco de viés, 8 artigos estavam categorizados como coorte e 3 como ensaios clínicos. Entre os estudos de caso controle, todos apresentavam moderado risco de viés e publicados pelo mesmo autor, SLATERY *et al.*

Discussão

Neste trabalho foram incluídos, 62 artigos. Deste, a maior parte estudos de coorte, com alto e moderado risco de viés. Dentro os 59 miRNAs avaliados, 36 miRNAs apresentaram pelo menos 1 estudo com impacto do miRNA no prognóstico dos pacientes. Dentre estes, somente 11 estudos apresentavam baixo risco de viés (8 coorte e 3 ensaios clínicos). Destes, 3 estudos não encontram associação dos miRNAs avaliados com os desfechos, os outros encontraram pelo menos 1 miRNA associado com o prognóstico dos pacientes.

Em nosso estudo, foi possível perceber uma grande variedade de perfis clínicos de pacientes, miRNAs e desfechos. A homogeneidade clínica entre os estudos, bem como padronização dos tipos de estudo é de extrema importância para a compilação de respostas uniformes e essencial para tentativa de translação de descobertas do meio da biologia molecular para a prática clínica. Desta forma, entendemos que de forma abrangente os trabalhos ainda são diversificados, utilizando diferenças demasiadas para podermos uniformizar processos de tomada de decisão que possam impactar diretamente no dia-a-dia dos oncologistas clínicos.

Além disso, em nosso estudo, não possível a realização de meta-análise. Além da não padronização e homogeneidade de variáveis importantes, já contextualizada anteriormente, poucos estudos apresentam baixo risco de viés. Os que apresentavam, não tinham homogeneidade clínica e técnica para realização de meta-análise. Este fator, entendendo que a avaliação de risco de viés é importante para a minimização de erros sistemáticos dentro de cada estudo individualmente, mostra-se limitador para realização de uma compilação adequada dos impactos dos miRNAs para a prática clínica. Apesar disso, foi possível analisar individualmente cada estudo e indicações de possíveis impactos importantes de miRNAs no prognóstico de pacientes com câncer colorretal.

Heterogeneidade, Implicações clínicas do baixo risco de viés

Nesta sessão buscaremos apresentar os principais miRNAs estudados, bem como aqueles que tiveram estudos de baixo risco de viés para que possamos ter possibilidade e sugestões para o processo de translação destes miRNA para a prática clínica em oncologia, bem como avaliando pelo nível de evidência dos estudos entre os de coorte (menor nível de evidência) e ensaios clínicos (maior nível de evidência).

O miR-21, principal miRNA citado pelos estudos, apresenta papel importante em processos de ligados à carcinogênese e implicação na expressão de vários genes chaves para o

desenvolvimento de cânceres, em especial o CRC. Seu aumento está ligado a desregulação do gene CDC4, que está diretamente relacionado com a progressão do adenoma intermediário para adenoma tardio, fase pré-desenvolvimento de câncer. Em nosso estudo, verificamos que este miRNA, quando hiperexpresso está ligado a pior pronóstico em pacientes com estádios II e IV, bem como apresentando maior expressão em áreas de invasão tumoral e tecido metastático, além de menor sobrevida livre de recorrência nos pacientes hiperexpressos (ARNOLD *et al.*, 2017; SUNG *et al.*, 2020; LAM *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2015; WANG, 2020). Apenas este último estudo citado, mostrou-se com baixo risco de viés para avaliação do desfecho proposto. Outros dois estudos que avaliaram o mesmo miRNA e que apresentavam baixo risco de viés, não encontraram associação deste com o prognóstico avaliado (WANG, 2020; TIBERIO *et al.*, 2015). Apesar disso, a maior partes dos estudo que analisou a relação deste miRNAs encontrou associação com os desfechos avaliados. Dessa forma, o miRNA, apresenta-se como biomarcador capaz de avaliar o prognóstico de pacientes com câncer colorretal, porém ainda com necessidade de estudos com menor risco de viés e padronização de suas amostras na tentativa de implantar este miRNA efetivamente na prática clínica.

O miR-200c, também presente entre 3 miRNAs mais citados em no estudo, mostra-se como miRNA chave ligado à vários genes importantes no processo de desenvolvimento do CCR. Juntamente com outros membros da família mir-200, como o miR-200a, miR-200b são capazes de regular processo de inflamação tecidual e proliferação celular importantes para o desenvolvimento do CCR. Em nosso estudo, apenas 2 trabalhos que avaliaram este miRNA apresentam baixo risco de viés. O estudo de Li et al 2015 não encontrou impacto da expressão desse miRNA no prognóstico avaliado, assim como para o miR-200b também não foi encontra associação, sendo este também um dos estudos de baixo risco de viés de nossa amostra (GUYATT *et al.*, 2011). Porém, no estudo de Toyama 2014 o seu aumento, está ligado a um pior prognóstico (HR=4.51, 95% CI=1.56–13.01 $P=0.005$). Dessa forma, este miRNA, bem como outros membros de sua família, mostram-se como potencial marcador prognóstico para o CRC.

Em relação aos miRNAs menos citados nos estudos de coorte avaliados, porém estes estudos tendo baixo risco de viés podemos destacar os miRNAs miR-122 (28), miR-143 (24), miR-181a (39), miR-320c. Assim, nesta avaliação todos os estudos foram capazes de encontrar impacto negativo da expressão, seja hiperexpressão (28) ou hipoexpressão (24, 39), na sobrevida dos pacientes com CCR (28, 24, 39).

O miR-122 está ligado a vias de sinalização regulatórias de processos inflamatórios do NF-KB e o gene NOD2, podendo regular estes processos favorecendo o desenvolvimento ou evolução do CCR. Já o miRNA-143 apresenta ação inibitória em várias vias de sinalização celular capazes de ativar o processo de mitose, como mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) and hepatocyte growth factor/Met tyrosine kinase (HGF/Met, assim, sua hipoexpressão pode exacerbar as ações dessas vias levando a pior prognóstico nestes pacientes. O miR-181 está ligado a vários genes reguladores de vias de proliferação celular como a Wnt inhibitory factor-1 (*WIF-1*) e pode regular cascatas de ativação para progressão tumoral e metástase. Além disso, sua ligação com a via de sinalização do VEGF mostra-se como potencial para marcadores durante o tratamento com anti-EGFR e potencia para avaliação de resistência e pior prognóstico nos pacientes tratados com esses medicamentos. Para o miR-320 que está codificado dentro de uma região promotora rica em CpG do gene POLR3D importante para o ciclo celular, normalmente é alvo frequente durante o processo de desenvolvimento tumoral.

Limitações do estudo

Como limitações deste estudo podemos destacar o grande número de miRNAs avaliados, bem como o número de desfechos potencialmente importantes, além da não realização de análise integrada com meta-análise. Para minimização destes aspectos, buscamos categorizar os estudos por tipo de estudo que nos dessem maior segurança em termos de nível de evidência, bem como realizar análise de sub-grupo segundo o risco de viés individual de cada estudo, segundo cada tipo de estudo avaliado. Desta forma, apesar de não ser possível a realização de meta-análise, devido a grande heterogeneidade clínica dos estudos, a realização da análise de sub-grupos e avaliação do risco de viés ajustam aspectos importantes para tomada de decisão e conclusão deste artigo.

Conclusão

Desta forma, foi possível identificar miRNAs potencialmente importantes e com validade técnicas e menor risco de viés por sub-grupo de estudos que possam ser utilizados na prática clínica, na tentativa de avaliar piores prognósticos ou perfis diferentes de pacientes que possam ter melhores desfechos clínicos no dia-a-dia do tratamento para o câncer colorretal. Dentre eles, os miRNAs mir-21, miR-220c, mir-122, miR-143, mir-181a e miR-320c

apresentaram impactos em desfechos clínicos importantes, com estudos avaliados com baixo risco de viés, sendo potenciais biomarcadores para o CCR.

Conteúdo Digital Suplementar

Conteúdo Digital Suplementar 1 - Fatores prognósticos e preditivos

Conteúdo Digital Suplementar 2 - Check list PRISMA-P

Conteúdo Digital Suplementar 3 - Medline database

Conteúdo Digital Suplementar 4 - Scopus database

Conteúdo Digital Suplementar 5 - Web of Science database

Conteúdo Digital Suplementar 6 - Cochrane Clinical Trials database

Conteúdo Digital Suplementar 7 - EMBASE database

Conteúdo Digital Suplementar 8 - Data dictionary for extract data

Conteúdo Digital Suplementar 9 - Flow Diagram PRISMA

4.3 Capítulo 3 - Avaliação da expressão de mirnas e relação com a via de sinalização do gene *kras* e *sp1* em pacientes com câncer colorretal: avaliação integrativa de bases de dados

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais incidente no mundo. Sua mortalidade está entre as cinco primeiras entre todos os tipos de câncer. Somente nos Estados Unidos (USA) eram esperados 147 mil novos casos em 2020 e 53 mil novas mortes, segundos dados do Instituto Nacional do Câncer americano (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Devido sua mortalidade, que pode chegar a 13% em 5 anos, o CRC se tornou um problema de saúde pública (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019).

Vários fatores estão relacionados ao prognóstico e tomada de decisão do tratamento do CRC (MARMOL *et al.*, 2017). Alguns deles, como mutações específicas em genes importantes da via de sinalização do processo de seu desenvolvimento, como o gene *KRAS*, podem direcionar o tratamento e determinar melhor ou pior prognóstico para pacientes (CICENAS *et al.*, 2017). Outros fatores, como o estadiamento e idade, também podem determinar prognósticos distintos (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

Dentro desta perspectiva, novos biomarcadores são estudados na tentativa de desenvolvimento de marcadores prognósticos que possam auxiliar médicos a direcionar melhor o tratamento, bem como indicar maior risco de morte ou recidiva para pacientes com esta patologia (KATHER; HALAMA; JAEGER, 2018). Assim, fatores epigenéticos, que se caracterizam por não estarem ligados diretamente a modificações no DNA, passaram a ser estudados como potenciais biomarcadores moldáveis, tendo em vista que podem apresentar interação com o meio na tentativa de modificar a expressão de genes, alterando a quantidade e ação de proteínas (ZAMANI; HOSSEINI; MOKARRAM, 2018).

Nesse sentido, miRNAs são RNA não codificantes de 19-25 nucleotídeos que não codificam proteínas, mas agem na regulação de RNA mensageiros (mRNAs) (CHAN; TAY, 2018). Normalmente, estão ligados à regulação negativa desses mRNAs, podendo moldar a codificação de proteínas em determinados ambientes ou tecidos (LU; ROTHENBERG, 2018). No CCR, podem agir atuando diretamente no processo de carcinogênese, e têm sido utilizados como biomarcadores prognósticos e preditivos para o monitoramento e tratamento de pacientes com CCR (COLAPRICO *et al.*, 2016). Como exemplo, o miR-21, pode ser

superexpresso em pacientes com CCR, induzindo à desregulação do processo de morte celular programada ao agir na proteína Pdcd4 (HSU *et al.*, 2011; COLAPRICO *et al.*, 2016; KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019). Portanto, níveis elevados de miR-21 estão associados a uma menor probabilidade de remissão clínica e a um estágio mais avançado do tumor no momento do diagnóstico do que níveis baixos de miR-21 (ITO *et al.*, 2022).

Baseando-se no exposto, este estudo tem por objetivo avaliar a expressão de miRNAs e relação com a via de sinalização do gene KRAS em pacientes com câncer colorretal, utilizando avaliação integrativa de bases de dados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras/Amostragem

Para este estudo, os dados foram obtidos de três tipos de amostra: i) Tecidos Parafinados de pacientes em centro de tratamento; ii) Amostras do The Cancer Genome Atlas Program (TCGA); e iii) “Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)”.

Para obtenção dos dados relacionados à expressão de miRNAs de pacientes com câncer colorretal do TCGA, foi utilizado pacote do programa R (versão 3.6), chamado TCGAbiolinks (10). Os parâmetros para obtenção dos dados foram avaliados a partir dos projetos *Cancer Genome Atlas Rectum Adenocarcinoma* (TCGA-READ) e *Genome Atlas Colon Adenocarcinoma* (TCGA-COAD), consultados na base de dados on-line TCGA “*GDC Data Portal*” (<https://portal.gdc.cancer.gov>). Esses projetos apresentavam somente dados e amostras de pacientes com câncer de cólon e reto, bem como tecido adjacentes coletados destes pacientes de maneira padronizada e similar em ambos. Os parâmetros de busca foram; i) *Data Type: miRNA gene quantification; miRNA Expression Quantification*; ii) *Data Category: Gene expression. Transcriptome profiling*; iii) *Experimental strategy: miRNA-Seq*; iv) *Typesample: TP- Primary solid tumor / NT- Solid Tissue Normal*

Para obtenção dos dados brutos de sequenciamento do ENCONDE, inicialmente consultamos a base on-line (<https://www.encodeproject.org>). Em seguida, foi estabelecido filtro para *small-RNA-Seq*, seguido de escolha por tecido (cólon sigmoide e transversal). Em seguida utilizou-se o terminal Linux para download das amostras em formato fastq.

Análise de expressão diferencial de miRNAs e predição de alvos

Expressão diferencial TCGA (TP X NT) - Projetos TCGA-COAD e TCGA-READ: Para análise de expressão diferencial de miRNAs utilizando os controles próprios “saudáveis” do TCGA, foram utilizados scripts pré-definidos pelos desenvolvedores do pacote TCGAbiolinks [74] no software R. Este, por sua vez, utiliza o pacote *edgeR* [76] para avaliação dos miRNAs diferencialmente expressos.

Expressão diferencial TCGA *readcounts* x ENCODE *readcounts*: Para análise de expressão diferencial de miRNAs dos dados disponibilizados pelos projetos do TCGA em comparação com os dados de expressão de miRNAs obtidos pelo *pipeline miARma-seq* [77] de amostras do ENCODE como controles saudáveis foi utilizado o *Differential expression module* do *pipeline miARma-seq* [77].

Inicialmente, foi necessário montar uma matriz global de *readcounts* dos dados obtidos do TCGA e ENCODE. Para isso, utilizou-se algoritmo desenvolvido no software Python 3. Este algoritmo tem por finalidade anexar todos os dados de *readcounts* individuais de cada paciente disponibilizados pelo TCGAbiolinks [74] e os dados de *readcounts* obtidos pelo *pipeline miARma-seq* na análise das amostras do ENCODE.

Predição de genes alvos dos miRNAs: Para predição de genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, foi utilizada a base de dados miRTarBase (11). Nesta base é possível avaliar o nível de evidência para a validação dos genes alvos para miRNAs já descritos e categorizados na base miRBase (12). Esta base define:

- *High evidence*
- *Low evidence*

Além disso, a base *miRTarBase* (11) fornece dados dos estudos de validação dos genes alvos dos miRNAs e suas relações e potenciais impactos na expressão dos genes e suas vias de sinalização.

Análise de Dados

Para as análises foi utilizado o Software R. Para construção de *Volcano Plots* foi utilizado o pacote *EnhancedVolcano*. Os parâmetros utilizados para definição de miRNAs que apresentaram expressão estatisticamente significativa foram: $FDR < 10$ e $\logFC > 3$. A análise

de interação/rede e montagem de diagramas foi realizada por meio do software Cytoscape, com dados gerados pela plataforma String e processos por pipeline Python específico.

As variáveis categóricas foram descritas segundo suas frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas contínuas que apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$ – Teste Shapiro Wilk) foram descritas segundo média e desvio padrão. Já as variáveis quantitativas contínuas de distribuição não normal ($p < 0,05$ – Teste Shapiro Wilk) foram descritas segundo mediana e percentis 25% e 75%.

Resultados

As características clínicas dos indivíduos analisados do TCGA constam na Tabela 1. A mediana de idade foi de 68 anos (58-76 anos p25%-75%).

Tabela 4 – Avaliação das características clínicas pacientes CTGA

Característica	N(%)
Sexo	
Masculino	321 (52,62%)
Feminino	289(47,38%)
Estádio	
I	104(17,00)
II	220(36,10)
III	177(29,00)
IV	89(14,60)
Não avaliado	20(3,30)
Lado tumoral	
Direito	212(35,00)
Esquerdo	287(47,00)
Não especificado	111(18,00)

A expressão diferencial dos miRNAs, foi avaliada de 3 maneiras distintas. Inicialmente foram avaliados os miRNAs diferencialmente expressos nos tecidos tumorais primários utilizando como controle o tecido colônico “normal” adjacente às amostras tumorais, disponibilizados no TCGA. As análises foram divididas para os pacientes com câncer de cólon (COAD) e reto (READ).

Em seguida, foi avaliada a expressão diferencial dos miRNAs utilizando como controle os sequenciamentos disponíveis na base ENCODE analisadas pelo miARma-seq pipeline.

TCGA-COAD: Tumor Tissue x Normal Adjacent Tissue

Quando avaliamos a expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon (Projeto TCGA COAD) em comparação com controles *self* é possível encontrarmos 107 miRNAs diferencialmente expressos (Tabela 5 – Figura 8) levando em consideração $\text{LogFC} > 3$ e $\text{FDR} \leq 10^{-6}$.

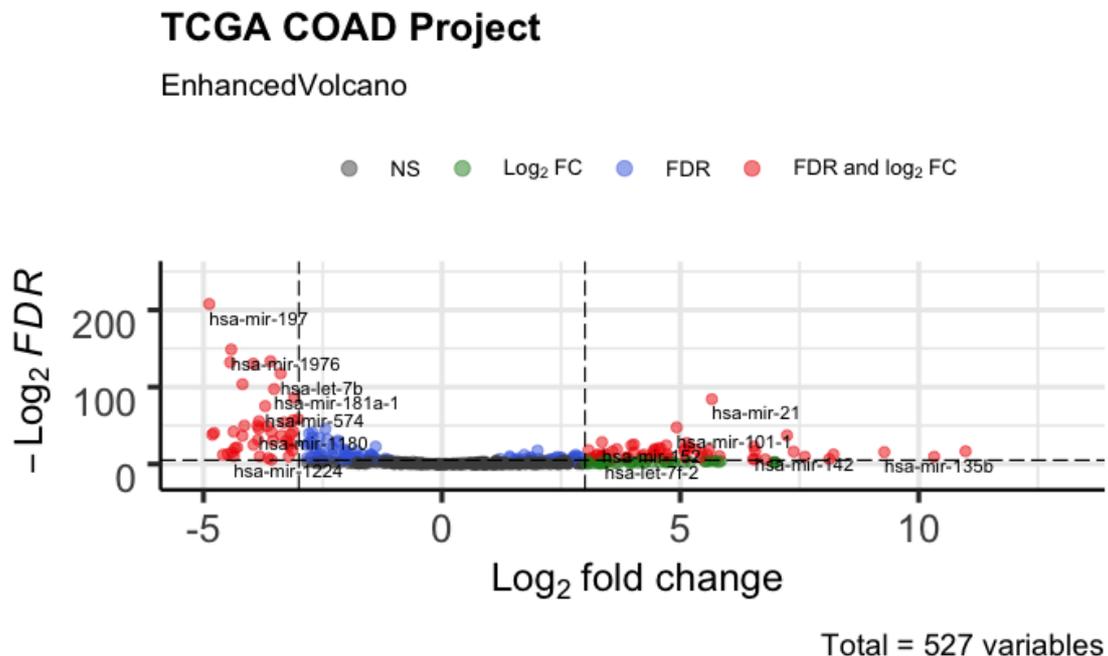
Tabela 5 – número de miRNAs com significância

LogFC* & FDR**	FDR**	Sem Significância
107	81	339

* $\text{logFC} > 3$

** $\text{FDR} \leq 10^{-6}$

Figura 8 – Avaliação da expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon – TCGA COAD



Fonte: Análise de dados interna

TCGA- READ: Tumor Tissue x Normal Adjacent Tissue

Quando avaliamos a expressão diferencial dos indivíduos com câncer de reto (TCGA READ) em comparação com controles *self* é possível encontrarmos 87 miRNAs diferencialmente expressos (Tabela 6 – Figura 9) levando em consideração $\text{LogFC} > 3$ e $\text{FDR} \leq 10^{-6}$.

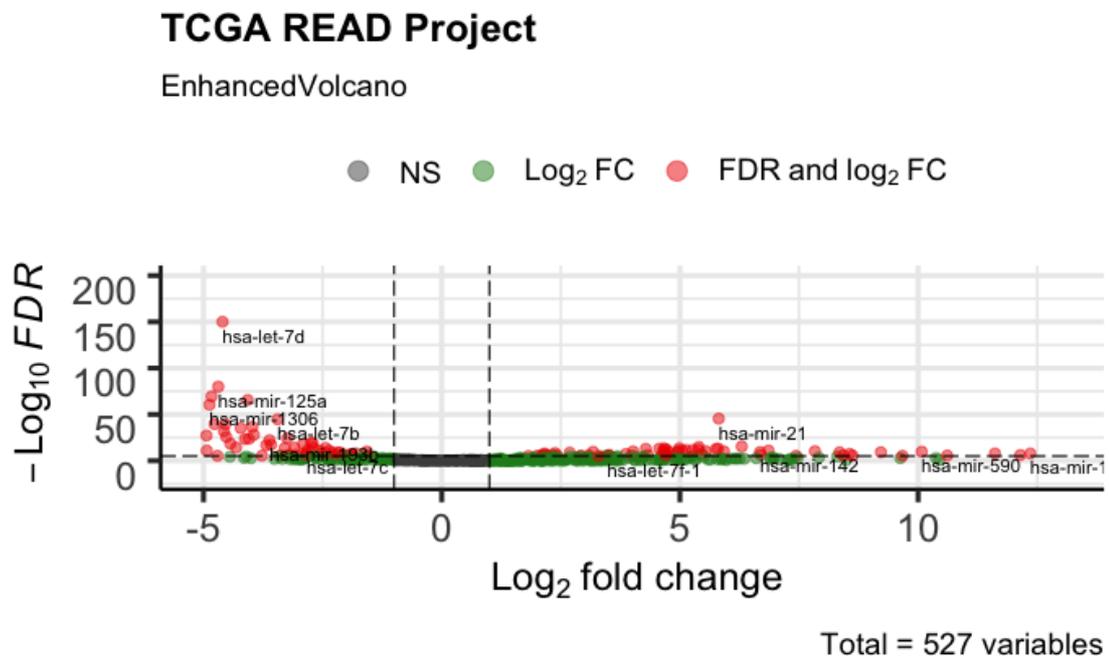
Tabela 6 – número de miRNAs com significância

LogFC* & FDR**	FDR**	Sem Significância
87	29	411

*logFC>3

*FDR<=10e-6

Figura 9 – Avaliação da expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon – TCGA READ



Fonte: análise de dados internos

TCGA (COAD/READ) x Normal tissue (ENCODE)

Na avaliação da expressão diferencial global dos indivíduos com câncer colorretal (Projetos TCGA COAD/READ) em comparação com controles *non-self* retirados do ENCODE, é possível encontrarmos 977 miRNAs diferencialmente expressos (Tabela 7 – Figura 10) levando em consideração LogFC>3 e FDR<=10⁻⁶.

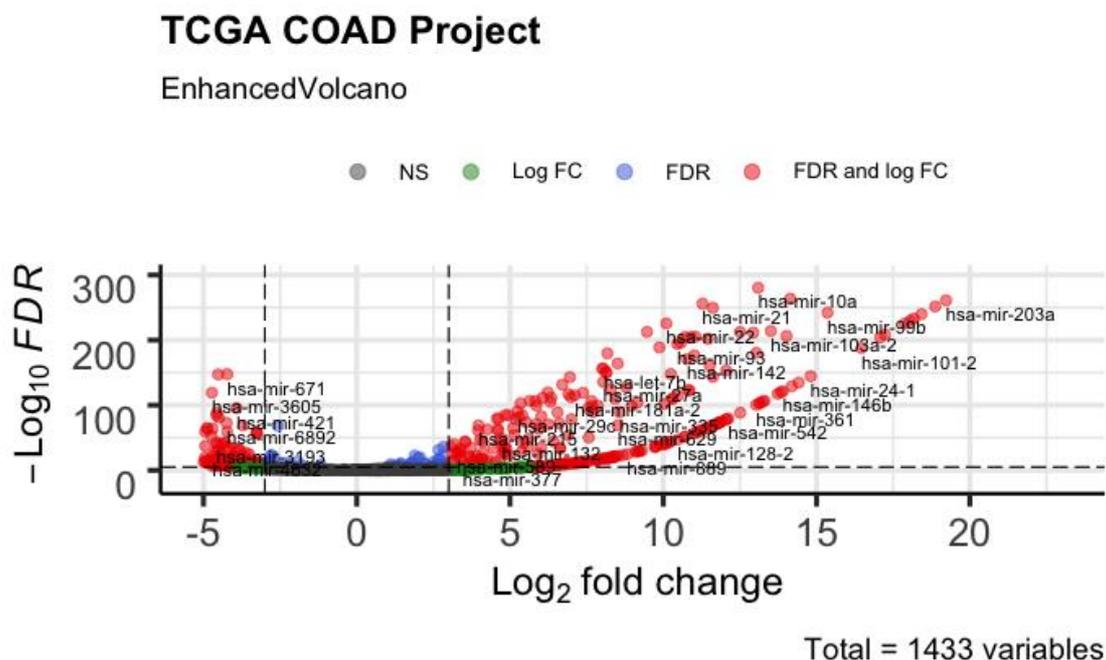
Tabela 7 – número de miRNAs com significância

LogFC* & FDR**	FDR**	Sem Significância
977	52	404

*logFC>3

*FDR<=10e-6

Figura 10 – Avaliação da expressão diferencial dos indivíduos com câncer de cólon – TCGA COAD - ENCODE



Fonte: Dados de análise interna

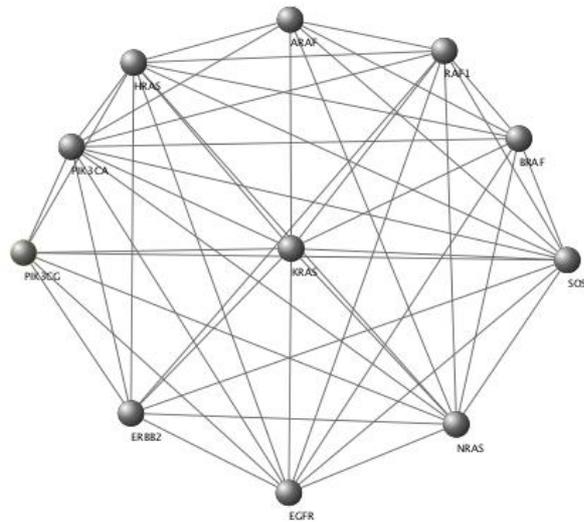
Escolha dos miRNAs e vias de sinalização do gene KRAS.

A partir dos dados de expressão diferencial de miRNAs dos projetos TCGA-COAD, TCGA-READ e TCGA x ENCODE, bem como os genes alvos preditos, foram avaliados os miRNAs significativamente expressos de forma diferencial ligados à via de sinalização do gene *KRAS*.

Avaliação dos genes relacionados ao gene KRAS

Inicialmente, utilizamos a plataforma *STRING* para avaliação dos genes que estão ligados à via de sinalização do gene *KRAS*. Por meio desta avaliação foi possível elencar os genes (*ARAF*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*, *RAF1*, *HRAS*, *ERBB2*, *EGFR*, *SOS1* e *PIK3CG*) (Figura 11)

Figura 11 – Avaliação de rede de interação do gene *KRAS* com genes associados à carcinogênese do CCR



Fonte: Dados de análise interna

Genes da via de sinalização KRAS e miRNAs diferencialmente expressos

Para cada análise realizada (TCGA-READ, TGCA-COAD e TCGA x ENCODE) foi avaliado a presença de miRNAs expressos de maneira significativamente diferenciada e predição dos genes alvos ligados à via de sinalização do gene *KRAS*, bem como ao próprio gene *KRAS*. Após esta avaliação, foram obtidos os seguintes miRNAs com expressão significativamente diferenciada ligados aos genes da via de sinalização (quadros 3 e 4).

Quadro 3 - Genes e miRNA Relacionados

GENE	miRNA
<i>KRAS</i>	has-mir-217
	has-mir-326
	has-mir-429
	hsa-mir-3916
	hsa-mir-4314
	hsa-mir-4689
	hsa-mir-4698
<i>PIK3CA</i>	hsa-mir-375
<i>EGFR</i>	hsa-mir-133b

	hsa-mir-2861
<i>NRAS</i>	hsa-mir-1303
	hsa-mir-2278
	hsa-mir-3143
	hsa-mir-3650
	hsa-mir-3662
	hsa-mir-4257
	hsa-mir-4480
	hsa-mir-548u
hsa-mir-922	
<i>HRAS</i>	hsa-mir-4292
	hsa-mir-663a

Quadro 4 - Genes e miRNA Relacionados

<i>GENE</i>	<i>miRNA</i>
<i>RAF1</i>	hsa-mir-3134
	hsa-mir-4534
	hsa-mir-4688
<i>PIK3CG</i>	hsa-mir-3689e
	hsa-mir-3941
	hsa-mir-603
	hsa-mir-8485
<i>ERBB2</i>	hsa-mir-326
	has-mir-375
	hsa-mir-4273
	hsa-mir-4427
	hsa-mir-4441
	hsa-mir-4506
	hsa-mir-4748
	hsa-mir-559

Escolha dos miRNAs alvos para validação

Em seguida à avaliação dos genes alvos acima, utilizou-se a base miRTarBase para analisar os potenciais de ação dos miRNAs nestes genes. Para isso os seguintes parâmetros foram utilizados: i) já estudado para amostras de tecido de câncer colorretal e validado nessas amostras; ii) já estudados para amostras de tecido de câncer colorretal, mas ainda não validado; iii) já estudado para outros tipos de câncer tendo validação ou não. Após avaliação individual de cada miRNA na base estudada, chegou-se a seguintes miRNAs para validação por QT-PCR.

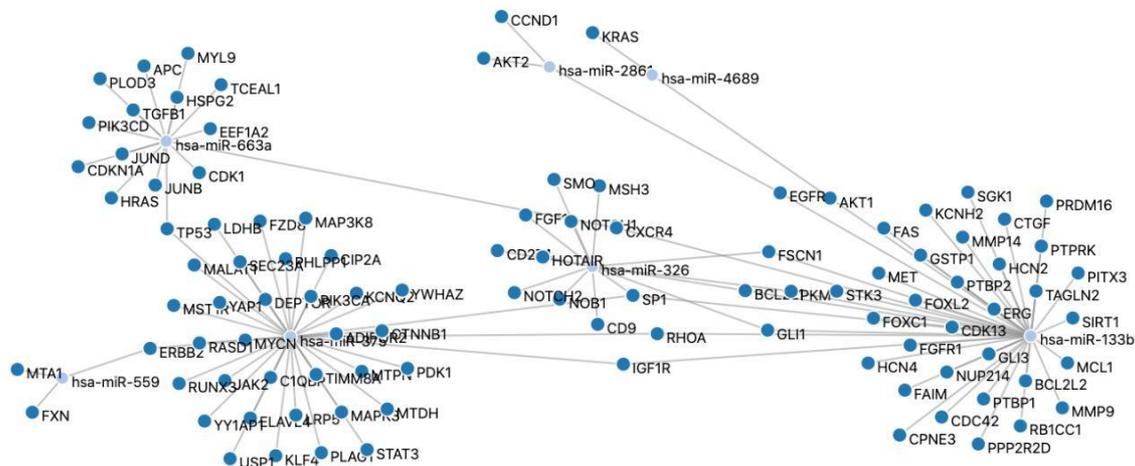
Quadro 5 – Genes e miRNA Relacionados

GENE	miRNA
<i>KRAS</i>	has-mir-217
	has-mir-326
	has-mir-429
	hsa-mir-4689
<i>PIK3CA</i>	hsa-mir-375
<i>EGFR</i>	hsa-mir-133b
	hsa-mir-2861
<i>HRAS</i>	hsa-mir-4292
	hsa-mir-663a
<i>ERBB2</i>	hsa-mir-326
	has-mir-375
	hsa-mir-559

Network analysis

Após avaliação e escolha dos miRNAs para validação, foi realizada network analysis por meio de protocolo estipulado por (POMPEU *et al.*, 2019). Esta ferramenta leva em consideração miRNAs com pelo menos dois experimentos de validação para relação com os genes alvos. Dessa forma, foi possível encontrar que dentre os miRNAs avaliados, três deles (hsa-mir-326, hsa-mir-375 e hsa-mir-133b) regulavam para um único gene centralmente posicionado, SP1.

Figura 12 – network analysis de miRNAs selecionados para validação



Fonte: Fonte: Dados de análise interna

Discussão

Fatores epigenéticos, como miRNAs, podem alterar de maneira significativa os prognósticos de pacientes com CRC e devem ser validados de maneira extensiva (POMPEU *et al.*, 2019). Dessa forma, em nosso trabalho podemos verificar importantes diferenças entre a avaliação da expressão de miRNAs de pacientes com CRC em comparação com controles saudáveis e self-controls, chegando a avaliar 870 miRNAs diferencialmente expressos a mais na comparação com os controles saudáveis. Além disso, quando avaliamos as ligações entre vias de sinalização importantes para o desenvolvimento e prognóstico do CRC, como a via do gene KRAS foi possível encontrar que três miRNAs (hsa-mir-326, hsa-mir-375 e hsa-mir-133b) relacionavam-se com um único gene centralmente posicionado, gene SP1.

Na avaliação da expressão diferencial de miRNAs entre tecidos cancerígenos e tecidos normais, podemos utilizar tecidos sadios adjacentes dos próprios pacientes ou tecidos saudáveis de pacientes sem a doença. Porém, a utilização de tecido adjacente ao tumor, mesmo fora da margem cirúrgica, é, de certa forma, equivocada. Estudos sugerem que estes tecidos podem já está em processo de transformação neoplásica (MARQUES, 2020; HENN, 2019; KHOSHNAM, 2017). Assim, em nosso estudo podemos avaliar mais de 800 miRNAs diferencialmente expressos quando utilizamos tecido colônico de indivíduos normais, em comparação com as amostras tumorais adjacentes ao tumor. Estudo mostra esta diferença também quando comparamos tecido normal, tecido normal adjacente, tecido adenomatoso e tecido cancerígeno (ITO *et al.*, 2022). Ainda neste ponto, não somente a expressão de miRNA comporta-se de maneira diferente nessas comparações, mas também a expressão de genes mostra-se diferente quando comparamos diferentes tecidos (WENTZENSEN *et al.*, 2004). Desta forma, a utilização de tecido tumoral adjacente utilizado como controle saudável pode levar a erros na interpretação de dados relacionados à expressão diferencial de miRNAs.

Na avaliação da ligação das vias de sinalização importantes para o CRC, o gene KRAS comporta-se como passo fundamental tanto para a carcinogênese, bem como fator prognóstico e preditivo de suma importância da condução destes pacientes (NGUYEN; DUONG, 2018). Além disso, estudo sugere que pacientes com câncer colorretal metastático podem ter uma taxa de mutação menor no estado do Pará, quando comparado com outros estudos maiores em outras localidades do mundo (CARVALHO, 2017).

Outros genes, como o gene SP1, apresentam função importante na regulação de vários marcadores para os processos de carcinogênese e vias interliga-das do câncer colorretal

(HANAHAN, 2022). O *SP1*, além disso, regula genes diretamente ligados a vias do gene *KRAS*, como o *EGFR*. Apesar de não estarem ligados diretamente por vias de sinalização celular clássicas quando avaliados pela plataforma STRING, estes genes aparentam estar relacionados por mecanismos epigenéticos importantes, como as modificações de expressão do miR-137 sinalizando para modificações na via MEK-SP1-DNM1 com potencial impacto para a utilização de drogas inibidoras do MEK (SZKLARCZYK *et al.*, 2019; CHU *et al.*, 2018). Entendendo esta avaliação, nossa análise indicou que três miRNAs apresentavam expressão diferencial e estavam interligados com a via do SP1.

Apesar de não apresentar relação documentada com o câncer colorretal, o miR-326 mostra-se importante para vias de sinalização em outros cânceres (SZKLARCZYK *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018). A hipoexpressão deste miRNA está intimamente ligado a uma piora substancial no prognóstico, desenvolvimento tumoral, metástase e progressão tumoral em pacientes com câncer gástrico e de pulmão (SUN *et al.*, 2016; HONG *et al.*, 2014; THOMAS *et al.*, 2015). Em nossa análise, este miRNA encontrava-se hipoexpresso na avaliação dos estudos COAD e READ, porém não quando comparamos os dados de expressão com indivíduos normais.

O mir-375 encontra-se ligado à via de sinalização do gene SP1, inclusive em indivíduos com CRC (LIU; WANG; DONG, 2018; WEI YAN; SHENG LIN; XING-XING, 2013). A hipoexpressão desse miRNA em células de CRC foi relacionada com pior prognóstico, bem como seu enriquecimento evidenciou uma maior sensibilidade a drogas como a 5FU (XU *et al.*, 2019). Verificou-se que miR-375 inibiu a proliferação, invasão e migração em células DLD1 e HCT8. Além disso, miR-375 regulou negativamente a proteína do fator de transcrição Sp1 (SP1) pela ligação direta à região 3'-não traduzida (3'-UTR) - em nossa avaliação (CUI *et al.*, 2016).

O miRNA-133b encontra-se ligado a várias vias de sinalização relacionados ao CRC (29-31). Sabe-se que a hiperexpressão do miRNA-133b pode induzir a permanência da fase G1 em linhagens celulares de câncer gástrico e inibir a proliferação celular, migração e invasão celular (QIU *et al.*, 2014). A hipoexpressão desse miRNA em culturas celulares de CRC pode afetar potencialmente a proliferação celular e a apoptose tendo como alvo os receptores de tirosina kinase MET (XIE *et al.*, 2021). Além disso, experimentos *in vitro* utilizando mir-133b mimético, em conjunto com inibidor de EGFR, Cetuximab, mostrou potencial efeito no crescimento e invasão de células de CRC em comparação com o tratamento isolado com Cetuximab (ZHOU *et al.*, 2015).

Quando avaliamos as limitações de nosso estudo, podemos elencar que a avaliação *in silico* realizada pode não ser suficiente para mostrar a relação dos miRNAs com os genes evidenciados. Há a necessidade de validações dessas relações por meio de técnicas mais específicas. Porém, buscamos bases de dados e avaliações robustas destas para gerar nossas relações. Utilizando de tomadas de tomada de decisões dessas bases e buscando o melhor nível de evidência indicado por elas na tentativa de minimizar estas possíveis fragilidades nas análises realizadas.

Além disso, o uso de várias bases integradas e a somatória de análises consecutivas podem gerar vieses nos resultados deste trabalho, o que deverá ser minizado pela validação destes dados por meio de técnicas como RT-PCR posteriormente a este estudo na tentativa de demonstrar as relações entre os miRNAs e os genes SP1 e KRAS.

Conclusão

Podemos concluir que a expressão dos miRNAs foi sobremaneira diferente na comparação entre tecidos controles saudáveis e dos próprios indivíduos com CCR. Além disso, os miRNAs mir-326, mir-375 e mir-133b mostraram-se como potenciais biomarcadores relacionados a vias de sinalização importantes para o CCR, podendo inclusive ser utilizados como possíveis tratamentos para esta patologia. Assim, são necessários estudos para validação dos potenciais impactos destes miRNAs nos prognósticos do CRC utilizando técnicas específicas.

4.4. Capítulo 4 – Os dois lados do mesmo Cólon- O cólon de pessoas normais é diferente? Uma avaliação integrativa de base de dados

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais incidente no mundo. Sua mortalidade está entre as 5 primeiras entre todos os tipos de câncer. Somente nos Estados Unidos (USA) são esperados 147 mil novos casos em 2020 e 53 mil novas mortes, segundos dados do Instituto Nacional do Câncer Americano (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Devido sua mortalidade, que pode chegar a 13% em 5 anos, o CRC se tornou um problema de saúde pública (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019).

O principal fator de risco para CCR é o envelhecimento, com 90% dos CCR diagnosticados aos 50 anos. A história familiar de CCR entre parentes de primeiro grau, principalmente antes dos 55 anos, dobra o risco de desenvolver CCR (LIEBERMAN *et al.*, 2012; JOHNS; HOULSTON, 2001). Além disso, os fatores prognósticos incluem o sexo e a localização anatômica do tumor (SHIN *et al.*, 2014). Pacientes com tumores de cólon direito apresentam maiores chances de serem diagnosticados em estádios mais avançados e um padrão de diferenciação celular mais agressivo do que pacientes com tumores de cólon esquerdo (NISHIHARA *et al.*, 2017).

Devido às diferenças moleculares encontradas nos diferentes tipos de CCR, uma nova classificação molecular foi proposta em 2015 pelo Colorectal Cancer Subtype Consortium (CRCSC), com quatro subgrupos denominados CMSs (Consensus Molecular Subtypes), cada um apresentando um padrão molecular distinto: CMS1, consistindo em tumores com MSI; CMS2, com tumores apresentando alterações nas vias WNT/MYC; CMS3, com tumores apresentando mutações KRAS; e CMS4, com ativação de TGF- β e VEGFR (7).

O principal fator de risco para CCR é o envelhecimento, com 90% dos CCR diagnosticados aos 50 anos. A história familiar de CCR entre parentes de primeiro grau, principalmente antes dos 55 anos, dobra o risco de desenvolver CCR (LIEBERMAN *et al.*, 2012; JOHNS; HOULSTON, 2001). Além disso, os fatores prognósticos incluem o sexo e a localização anatômica do tumor (SHIN *et al.*, 2014). Pacientes com tumores de cólon direito apresentam maiores chances de serem diagnosticados com estágios mais avançados e um padrão de diferenciação celular mais agressivo do que pacientes com tumores de cólon

esquerdo, sendo estes pacientes como maiores candidatos a um pior prognóstico (NISHIHARA *et al.*, 2017).

Dessa forma, este estudo tem por objetivo avaliar a expressão diferencial de miRNA entre os lados direito e esquerdo do cólon de pacientes saudáveis e pacientes com câncer utilizando análises de bioinformática e integração de bases de dados disponíveis on-line.

Método

Amostras/Amostragem

Para este estudo os dados de sequenciamento de indivíduos normais foram obtidos da “Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)”. Para obtenção dos dados brutos de sequenciamento do ENCODE inicialmente consultamos a base on-line (<https://www.encodeproject.org>). Em seguida, foi estabelecido filtro para small-RNA-Seq, seguido de escolha por tecido (cólon sigmoide e transverso). Foram encontrados 8 amostras (4 cólon transverso e 4 de cólon sigmoide) sequenciadas de 4 pacientes (2 homens e 2 mulheres). Em seguida utilizou-se o terminal Linux para download das amostras em formato fastq.

Definição dos lados tumorais

O cólon direito foi definido como as amostras de cólon transverso. O cólon esquerdo foi definido como as amostras de cólon sigmoide.

Expressão diferencial amostras Cólon Direito x Cólon Esquerdo

Para análise de expressão diferencial de miRNAs utilizando amostras obtidas de pacientes saudáveis por meio do ENCODE, foi utilizado *miARma-Seq pipeline para Known miRNAs*. Nesse pipeline utilizou-se:

Adapter Module: Cutadapt

Aligner Module: Bowtie 1

Differential Expression Module: edgeR

Como output do pipeline foi obtido os arquivos de *FeatureCounts* como matriz de *readcounts* para montagem de matriz global a posteriori. Além disso, os dados de expressão diferencial entre os tecidos do cólon sigmoide e cólon transverso foram obtidos em formato tvs.

Para avaliação da expressão diferencial entre os cólons direito e esquerdo comparando os dados do foram utilizados os pacotes *edgeR/limma* para avaliação dos miRNAs diferencialmente expressos.

Predição de genes alvos dos miRNAs

Para predição de genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, foi utilizada a base de dados miRTarBase. Nesta base é possível avaliar o nível de evidência para a validação dos genes alvos para miRNAs já descritos e categorizados na base miRBase. Esta base define:

- *High evidence*
- *Low evidence*

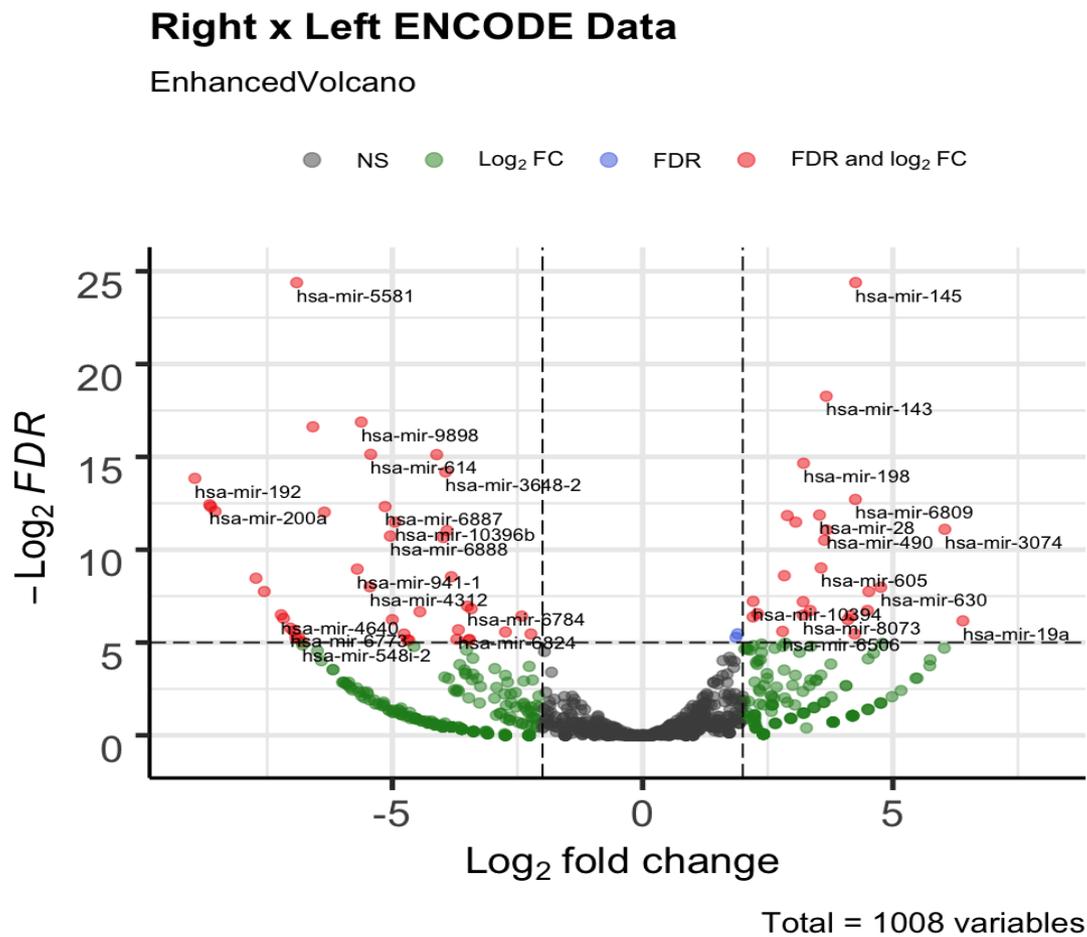
Além disso, a base *miRTarBase* fornece dados dos estudos de validação dos genes alvos dos miRNAs e suas relações e potenciais impactos na expressão dos genes e suas vias de sinalização.

Análise estatística

Para as análises foi utilizado o Software R. Para construção de *Volcano Plots* foi utilizado o pacote *EnhancedVolcano*. Para construção de mapas de calor e cluster segundo lados tumorais foram utilizados o pacote *ComplexHeatmap*. Os parâmetros utilizados para definição de miRNAs que apresentaram expressão estatisticamente significativa foram: $FDR < 10^{-6}$ e $\log_2FC > 3$. As variáveis categóricas foram descritas segundo suas frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas contínuas que apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$ – Teste Shapiro Wilk) foram descritas segundo média e desvio padrão. Já as variáveis quantitativas contínuas de distribuição não normal ($p < 0,05$ – Teste Shapiro Wilk) foram descritas segundo mediana e percentuais 25% e 75%.

Quando avaliamos a expressão diferencial entre os indivíduos normais, das amostras obtidas pelo ENCODE, é possível verificar 71 miRNAs diferencialmente expressos ($FDR < 10^{-6}$ e $\log_2FC > 3$). (Figura 13).

Figura 13 – Avaliação da expressão de miRNA lados direito e esquerdo em relação aos dados do enconde

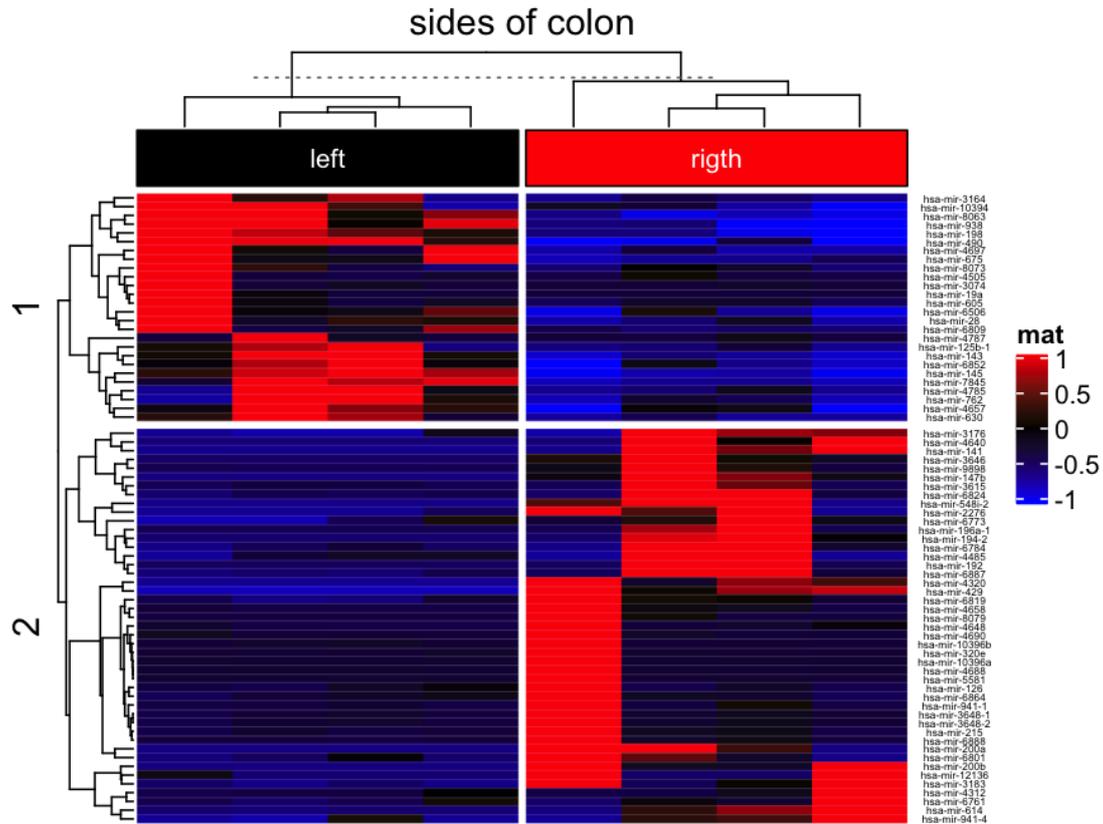


Fonte: Dados de análise interna

hsa-mir-198 (hiperexpresso no lado esquerdo) , hsa-mir-762 e hsa-mir-630
hsa-mir-147 e hsa-mir-429

Quando avaliamos os miRNAs diferencialmente expressos em heatmaps é possível verificar a formação de 4 clusters bem definidos. O primeiro sendo o grupo de miRNAs hiperexpressos do lado direito do cólon, o segundo o grupo de miRNA não expressos ou hipopressos deste mesmo lado. Além disso, o mesmo grupo de miRNAs hiperexpressos do lado direito encontra-se não expresso ou hipopressos do lado esquerdo do cólon, sendo que este padrão de troca também ocorre igualmente para o segundo grupo hipopressos do lado direito do cólon.

Figura 14 – Avaliação da expressão diferencial de miRNA entre os cólons direito e esquerdo.



Quadro 6 – MiRNAs diferencialmente expressos segundo clusters formados

miRNA	Grupo
hsa-mir-3164	Hiperexpresso no lado esquerdo e hipoexpresso do lado direito
hsa-mir-10394	
hsa-mir-8063	
hsa-mir-938	
hsa-mir-198	
hsa-mir-490	
hsa-mir-4697	
hsa-mir-675	
hsa-mir-873	
hsa-mir-4505	
hsa-mir-3074	
hsa-mir-19 ^a	
hsa-mir-605	
hsa-mir-6506	
hsa-mir-28	
hsa-mir-6809	
hsa-mir-4787	
hsa-mir-125b-1	
hsa-mir-143	
hsa-mir-6852	

Quadro 6 - MiRNAs diferencialmente expressos segundo clusters formados

miRNA	Grupo
hsa-mir-145 hsa-mir-7845 hsa-mir-4785 hsa-mir-762 hsa-mir-4657 hsa-mir-630	Hiperexpresso no lado esquerdo e hipoexpresso do lado direito

Quadro 7 – MiRNAs diferencialmente expressos segundo clusters formados

miRNAs	Grupo
hsa-mir-3176 hsa-mir-4640 hsa-mir-141 hsa-mir-3646 hsa-mir-9898 hsa-mir-147b hsa-mir-3615 hsa-mir-6824 hsa-mir-548i-2 hsa-mir-2276 hsa-mir-6773 hsa-mir-196a-1 hsa-mir-194-2 hsa-mir-6784 hsa-mir-4485 hsa-mir-192 hsa-mir-6887 hsa-mir-4320 hsa-mir-429 hsa-mir-6819 hsa-mir-4658 hsa-mir-8079 hsa-mir-4648 hsa-mir-4690 hsa-mir-10396b hsa-mir-320e hsa-mir-10396 ^a hsa-mir-4688 hsa-mir-5581 hsa-mir-126 hsa-mir-6864 hsa-mir-941-1 hsa-mir-3648-1 hsa-mir-3648-2 hsa-mir-215	Hiperexpresso no lado Direito e hipoexpresso do lado esquerdo

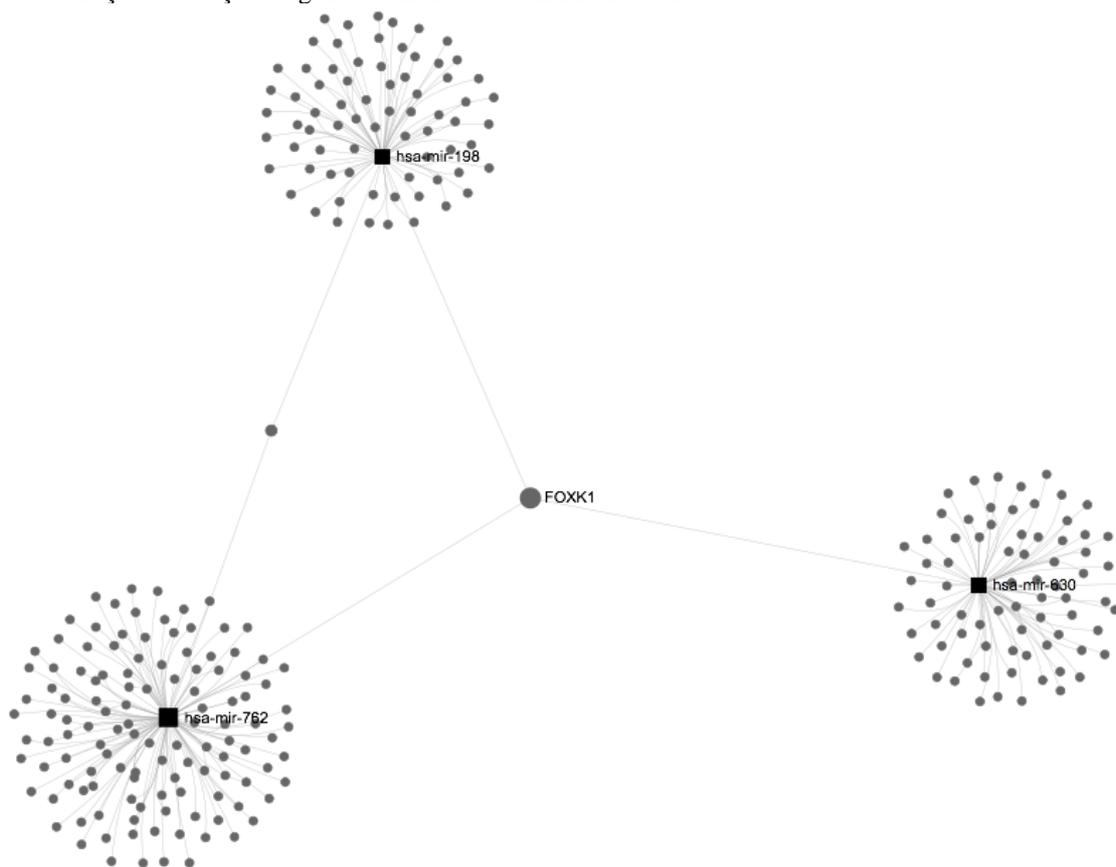
Quadro 7 - MiRNAs diferencialmente expressos segundo clusters formados

miRNAs	Grupo
hsa-mir-6888 hsa-mir-200 ^a hsa-mir-6801 hsa-mir-200b hsa-mir-12136 hsa-mir-3183 hsa-mir-4312 hsa-mir-6761 hsa-mir-614 hsa-mir-941-4	Hiperexpresso no lado Direito e hipoexpresso do lado esquerdo

Quando predizemos os genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos segundo os grupos de miRNAs dos clusters apresentados pela base miRTarBase, no primeiro grupo somente 3 miRNAs (hsa-mir-198, hsa-mir-762 e hsa-mir-630) apresentavam genes alvos preditos com alto nível de evidência com experimentos validados. Para o segundo grupo, somente 2 miRNAs (hsa-mir-147b e hsa-mir-429) apresentavam genes alvos preditos com alto nível de evidência com experimentos validados.

Por meio da plataforma mirnet (<http://mirnet.ca/>) para realização de network analysis (utilizando os parâmetros Organism: H. Sapiens; ID Type: miRBase ID; Targets: Genes-mirTarBase V8.0) podemos verificar que no primeiro grupo (Figura 15) os 3 miRNAs apresentam regulação para o gene *FOXK1*, porém sem alto nível de evidência e experimentos de consolidação.

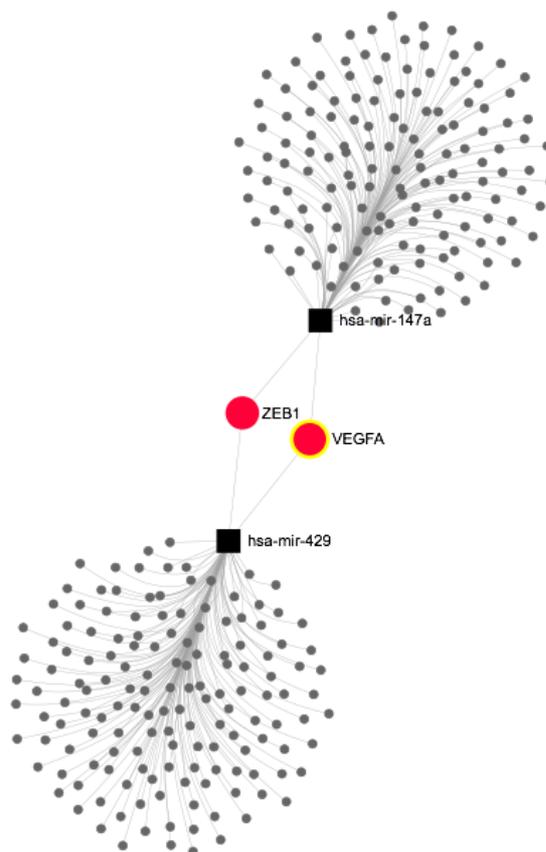
Figura 15 – Avaliação da relação do gene FOXK1 com os miRNAs avaliados



Fonte: Análise de dados interna

Seguindo os mesmos parâmetros acima, para os 2 miRNAs do segundo grupo, verificamos que não havia regulação conjunta dos miRNAs em genes compartilhados. Porém, ao avaliarmos os miRNAs hsa-mir-147a, miRNA da mesma família do hsa-mir-147b, encontramos a regulação para 2 genes (ZEB1 e VEGFA). Contudo, somente o gene VEGF com alto nível de evidência e experimentos de consolidação para o miR-429.

Figura 16 – Avaliação da relação dos miRNAs com os genes ZEB1 e VEGFA



Fonte: Análise de dados interna

Discussão

O CCR é uma doença extremamente heterogênea e com fatores de risco ligados à idade, hábitos alimentares e histórico familiar (KEUM, GIOVANNUCCI, 2019). Além disso, prognostic factors importante é anatomical location of the tumor (SHIN *et al.*, 2014). Alguns artigos evidenciam que with right colon tumors show higher chances of being diagnosed with more advanced stages and a more aggressive pattern of cellular differentiation than patients with left-sided colon tumors, sendo estes pacientes como maiores candidatos a um pior prognóstico (NISHIHARA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017, WAN *et al.*, 2017). Porém, será que indivíduos normais apresentam diferenças significativas em relação a fatores genéticos como expressões de genes chaves na carcinogênese ou fatores reguladores como expressão diferencial de miRNAs entre os lados tumorais?

Neste artigo avaliamos a expressão diferencial de miRNAs entre os lados direito e esquerdo do cólon em indivíduos saudáveis com dados advindos do ENCONDE. Foi possível observar a expressão diferencial de 2 grupos de miRNAs diferencialmente expressos bem

distintos entre os lados direito e esquerdo. Desses, somente os miRNAs hsa-mir-198, hsa-mir-762, hsa-mir-630 e hsa-mir-429 apresentavam alto nível de evidência para predição com genes FO XK1 e VEGFA (avaliando o miRNA hsa-mir-147a, da mesma família do miRNA hsa-mir-147b)

O mir-198 apresenta relação documentada com o CCR (LIAO *et al.*, 2019; MURAKAMI *et al.*, 2017). Quando hipoexpresso pode está ligado à via do gene Tenascin C, aumentando sua expressão e assim pode predizer menor tempo de aparecimento de metástase e pior prognósticos (MURAKAMI *et al.*, 2017). Além disso, o aumento de sua expressão em linhas celulares de CRC pode suprimir proliferação e invasão celular (LI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2014). Em nosso estudo, este miRNA esteve diferencialmente hipoexpresso do lado direito do cólon e hiperexpresso do lado esquerdo, mostrando assim perfil e microambiente possivelmente mais favorável ao lado direito do cólon em relação ao perfil relacionado à proliferação celular.

O miR-762, apesar de não está ligado diretamente e documentado em estudos com CCR, está relacionado a vias de sinalização que podem promover a proliferação celular em câncer de mama, câncer de bexiga, bem como o desenvolvimento de carcinoma oral escamoso quando hiperexpresso (LIN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2015). Este miRNA ainda está ligado a vias de sinalização não convencionais, utilizando circRNAs como intermediadores do processo de sinalização (LI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020). Em nossa análise novamente é possível avaliar que o lado esquerdo demonstra perfil mais favorável à proliferação celular e transformação neoplásica, estando o miRNA-762 hiperexpresso deste lado tumoral, quando comparado ao lado direito.

Hsa-mir-630 (Hiperexpresso no lado esquerdo e hipoexpresso do lado direito)

O mir-630 apresenta relação diretamente com vias importantes para o CCR e pode está ligado à resposta a quimioterapia pré-operatória nestes pacientes (ZHU *et al.*, 2017; LÖNNROTH *et al.*, 2014). Quando hiperexpresso está ligado ao aumento de invasão tumoral, estadiamento avançados e pior prognóstico clínico, evidenciando pior sobrevida (LÖNNROTH *et al.*, 2014; CHUN *et al.*, 2014). Em nossas análises este miRNA mostra-se com menor expressão do lado direito e maior expressão do lado esquerdo, mostrando novamente perfil mais favorável à proliferação celular, neste ultimo lado do cólon.

Este miRNA extensamente documentado em relação aos seus impactos em vias de sinalização chave no câncer colorretal, é membro da família miR-200, juntamente com o miR-200^a, miR-200b, miR-200c e miR-141 (HAMFJORD *et al.*, 2012; HEYDARI *et al.*, 2018). Porém, atuando por diversas vias sua relação com o prognóstico, bem como vias de proliferação

celular, é controversa. Quando relacionado ao gene HOXA5 pode comportar-se como oncomiRNA promovendo CRC progression e metástase, associado também ao gene SOX2 (HAN *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2018). Ainda, quando ligado à gente EMT pode está hipoeexpresso promovendo metilação e regulando negativamente o crescimento tumoral (DAVALOS *et al.*, 2012). Além disso, a família miR-200 pode está ligada à resistência adquirida ao uso de 5-Fluoracil com decreasing the levels of E-cadherin and PTEN protein (HEYDARI *et al.*, 2018). Em nossos dados este miRNA este hiperexpresso no lado direito do cólon e hipoeexpressos do lado esquerdo. É necessária uma avaliação das vias de sinalização e expressão de genes relacionados para ser possível determinar um possível de expressão e relação deste miRNA com o lado tumoral.

O miRNA-147b está ligado a vias de supressão tumoral, estando hipoeexpresso em linhagens celulares de câncer colorretal, bem como em testes *in vivo*, regulando negativamente vias como o RAP2B, importantes no ciclo celular nas fases G1/G0 (YIN *et al.*, 2019). Além disso, este miRNA pode está associado a mecanismos ligados a circRNAs que podem funcionar como esponjas captadoras de miRNAs regulando negativamente a presença e função do miR-147b, promovendo assim vias de sinalização que favoreçam a proliferação celular (CUI *et al.*, 2018). Em nossos dados, este miRNA esteve hiperexpresso do lado direito do colon, mostrando possível mais favorável ao lado esquerdo para aumento da proliferação celular.

O gene FOXC1 quando hiperexpresso está ligado a vários tumores, incluindo câncer gástrico e câncer colorretal. Além disso, sua expressão está relacionada ao desenvolvimento de metástase à distância em vários canceres (PENG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016). Em nossa avaliação, foi possível verificar que os 3 miRNAs (198, 627, 930) que estavam hipoeexpressos do lado direito e hiperexpressos do lado esquerdo apresentam relação com esse gene de forma central. Porém, são necessários estudos com maior nível de evidência, com validações por meio de técnicas como RT-PCR para validação da relação desses miRNAs e o gene FOXC1. Bem como, para demonstrar a relação de expressão entre esses miRNAs e o gene.

A Vascular endothelial-growth fator A (VEGFA) tem papel importante na angiogênese tumoral e é molecular alvo para os anticorpos anti-VEGF, como o bevacizumab, utilizado como primeira ou segunda linha para o tratamento de CCR metastáticos (BUCHLER *et al.*, 2014; JEVŠINEK *et al.*, 2019). Sua alta expressão pode está ligado a pior prognóstico em pacientes tratados com anticorpos anti-VEGF, com diminuição da sobrevida global (TAKAHASHI *et al.*, 2016). Quando avaliamos o impacto dos 2 miRNAs destacados (429, 147b) encontramos que o miR-429 apresenta relação negativa com este gene, sendo que sua alta expressão leva a diminuição da expressão do gene VEGFA (miRNA-FC: 4.71; geneFC: 1.39; R- 0,1)

(TAKAHASHI *et al.*, 2016). Para o miRNA 147b, não foram encontrados experimentos de validação para a relação deste com o gene VEGFA, sendo necessária avaliação por técnicas de RT-PCR.

Quando avaliamos as limitações de nosso estudo podemos elencar que a avaliação *in silico* realizada pode não ser suficiente para mostrar a relação dos miRNAs com os genes evidenciados e os prognósticos sugeridos. Porém, quando buscamos bases de dados e avaliações robustas destas para gerar nossas relações foi necessária tomada de decisões para dados que obtivessem maior nível de evidência na tentativa de minimizar este ponto.

Além disso, o uso de várias bases integradas e a somatória de análises consecutivas podem gerar vieses nos resultados deste trabalho. O que deverá ser minimizado pela validação destes dados por meio de técnicas como RT-PCR posteriormente a este estudo na tentativa de demonstrar as relações entre os miRNAs e os genes FOK1 e VEGFA.

Conclusão

Os cólons direito e esquerdo definitivamente são diferentes. Seus ambientes tumorais são diferentes, os tumores que surgem nestas localizações são diferentes e predizem diferentes prognósticos. Em nosso trabalho é possível sugerir um perfil de expressão menos favorável à proliferação celular do lado direito do cólon em comparação com o lado esquerdo, levando em consideração a expressão diferencial de miRNAs nestes dois lados do cólon em indivíduos saudáveis. Ainda assim, são necessários maiores estudos de validação para melhor elucidar esta afirmativa.

4.5 Capítulo 05 - Avaliação do impacto de snps nas vias dos genes HBEGF e TRFC em pacientes com câncer colorretal estágio inicial em centro de pesquisa na região amazônica brasileira - análise integrativa de bases de dados e técnicas de bioinformática

Introdução

O câncer colorretal está entre os cânceres que mais matam no mundo. No Brasil é a XIX neoplasia mais incidente, acometendo principalmente homens entre acima de XIX anos. Na região norte do país, é responsável por XIX mortes anualmente e juntamente com o câncer gástrico é fator importante para a saúde pública na região.

Os single nucleotide polymorphism (SNP) são alterações em uma única base nitrogenada na sequência de DNA e que estão presentes em pelo menos 2% da população. Essas alterações podem representar alterações diretas para a função de alguns genes, alterando a expressão dos genes em que estão inseridos ou de fatores transcricionais que controlam essa expressão.

Os genes HBEGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) e TRFC apresentam importante em diferentes vias de regulação para a carcinogense. O HBEGF apresenta regulação que pode ser importante para etapas fundamentais do desenvolvimento tumoral. Já o gene TRFC atua em processos regulatórios exercendo papel importante na regulação de fatores importantes para o desenvolvimento tumoral.

Dessa forma, só objetivo deste estudo é avaliar o impacto dos SNPs XIX e XIX nas vias de sinalização dos genes HBEGF e TRFC em pacientes com câncer colorretal estágio inicial em centro de pesquisa na região amazônica brasileira utilizando de análises interativas e técnicas de bioinformática para esta avaliação.

Método

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMABC, sob o parecer nº 2.001.795. Trata-se de um estudo observacional-descritivo, do tipo seccional, utilizando avaliação integrativo de bases de dados e técnicas In silico. Os sujeitos da pesquisa são pacientes portadores de câncer colorretal, com diagnóstico comprovado por exame histopatológico, atendidos em centro de referência em Oncologia no estado do Pará, Oncológica do Brasil. A amostragem foi feita de forma não probabilística, por conveniência.

Foi excluído da pesquisa todo paciente que: i); não aceitou os critérios do TCLE; ii) não realizou as coletas necessárias para obtenção de material para avaliação. A abordagem inicial aos pacientes foi feita em uma clínica particular de Oncologia na cidade de Belém (PA), o mesmo local onde foram coletados os dados sócio-demográficos e clínico-epidemiológicos, por meio de arquivos médicos.

Os dados clínicos coletados foram o tipo de neoplasia e estadiamento clínico. Foram coletadas duas amostras de tecido (tecido tumoral e tecido sadio) de cada paciente. Essas amostras foram armazenadas no Laboratório de Culturas de Tecidos e Citogenética, no Instituto Evandro Chagas, em Belém (PA). As amostras permaneceram conservadas em freezer a -80°C até o início do procedimento de extração de DNA total, pelo método de microcolunamento, sendo utilizado o kit Reliaprep gDNA tissue Miniprep System da Promega, seguindo as recomendações do fabricante. Destas, apenas uma amostra normal e todas as amostras tumorais se mostraram viáveis para prosseguir na avaliação. Após isso, foi realizado o procedimento de Hibridização genômica comparativa em arrays (aCGH) para avaliação dos SNPs presentes em cada amostra. Para o aCGH foram utilizadas as seguintes matrizes da Agilent: SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K (Agilent), para a análise simultânea SNPs e a análise de alterações do número de cópias (CNV) no genoma. O processamento do aCGH consiste em hibridização, lavagem e escaneamento. A Hibridização foi feita por 48 horas a 65°C . A lavagem da matriz foi realizada com o uso dos reagentes Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 e Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2. Foi utilizado a anotação do genoma humano GRCh37/hg19 proveniente do Genome Browser da University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Para todas as amostras avaliadas foram geradas bibliotecas por meio do programa Agilent. Todas as bibliotecas mapeavam os mesmos SNPs. Alguns dos SNPs avaliados são descritos não por seu genótipo, mas sim por “NN” que representa SNPs não possível de avaliar.

Dessa forma as 5 amostras foram comparadas enquanto a presença de genótipo mutado (homozigose, heterozigose, adição ou deleção) com a amostra de tecido normal. O script foi desenvolvido por meio da linguagem Python nos ambientes Jupyter Notebook e Spyder na plataforma de ciência de dados Anaconda e encontram-se disponível on-line (Github). Após a comparação entre as amostras foi desenvolvida estratégia de avaliação e predição de alvos genéticos para os SNPs utilizando a plataforma GWAS Catalog. Após avaliação de genes relacionados com os SNPs avaliados, foi utilizada a plataforma STRING (múltiplas proteínas, homo sapiens) para montagem de redes de interação e avaliação de vias de sinalização para genes alvos na cascata de desenvolvimento do CCR. Os genes elencados da cascata de

desenvolvimento foram: APC, KRAS, BRAF, DCC, SMAD4, CDC4, TP53, TGFBR2, BAX e IGF2R (NGUYEN; DUONG, 2018). [YSS5] Após a avaliação das vias de sinalização e pathways relacionados utilizou-se o programa cytoscape para apresentação gráfica das redes de interação.

Figura 17 – Fluxo de obtenção de dados a partir das amostras teciduais coletadas

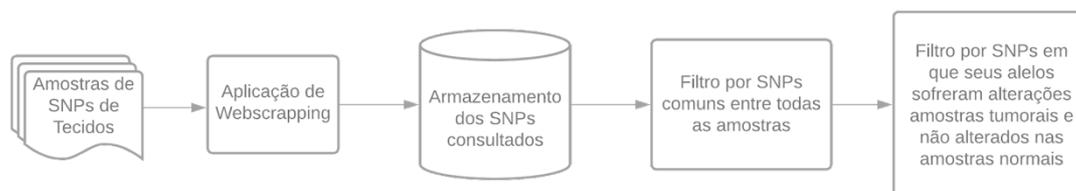
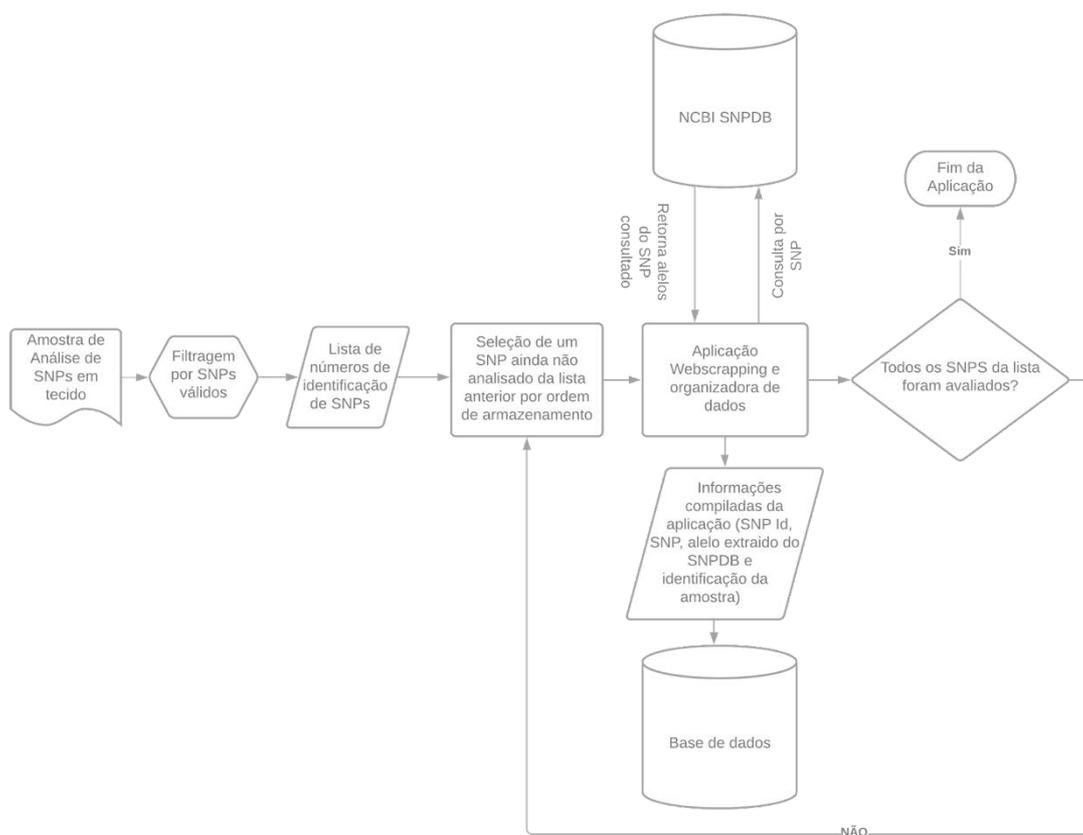


Figura 18 – Fluxo de validação das relações dos SNPs avaliados em conjunto com as bases de dados disponíveis no NCBI



Resultados

Foram incluídos na pesquisa seis amostras teciduais para compor o estudo: uma amostra de tecido colônico normal e cinco amostras de tecido tumoral. Após todos os processos de filtragem de dados, 26 SNPs foram selecionados para avaliação, estando todos eles alterados em pelo menos uma das seis amostras analisadas (Tabela 8).

Tabela 8 – Descrição dos status dos SNP avaliados nas amostras

ID SNP	Normal	Alterados			
		Homozigose	Heterozigose	Adição	Deleção
rs10061069	3	0	1	1	1
rs10078397	1	1	3	1	0
rs10520163	1	1	2	1	1
rs11168036	0	3	2	0	1
rs11733284	1	1	3	1	1
rs12513380	2	0	2	1	1
rs12517140	2	1	2	1	0
rs1438660	0	2	3	1	0
rs17641529	1	1	2	1	2
rs258951	2	0	2	1	1
rs26030	0	3	2	1	1
rs2894967	0	5	1	2	0
rs337705	4	0	1	1	0
rs4253252	2	2	0	1	1
rs4326010	3	0	1	2	1
rs4537030	1	0	3	2	2
rs464250	4	1	1	1	0
rs4869314	1	5	0	2	0
rs6447160	0	3	1	2	1
rs6555263	0	5	1	2	0
rs6595376	2	1	2	1	0
rs6826373	1	2	1	2	1
rs6851006	3	0	1	2	0
rs6874524	4	0	1	1	0
rs9291437	0	5	1	2	0
rs9859260	3	0	2	0	2

Fonte: análise de dados interna

Dentre os 26 SNPs avaliados, 7 deles estavam alterados em todas as amostras avaliadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Descrição dos SNPs que apresentaram alteração em todas as amostras e genes aos quais eles se relacionam

ID SNP	Gene(s) relacionado(s)
rs11168036	PFDN1, HBEGF
rs1438660	MAN2A1
rs26030	FAM174A
rs2894967	LINC02196
rs6447160	ATP8A1
rs6555263	LINC02063, AC106799.3
rs9291437	AC096719.1

Fonte: Análise de dados interna

Dentre os genes avaliados, apenas dois apresentaram relação com as vias do câncer colorretal: gene HBEGF (relacionado ao SNP rs11168036) e o gene TFRC (relacionado ao SNP rs9859260).

Discussão

Resumo geral dos resultados. Sucinto

O câncer colorretal é um dos cânceres mais incidentes do mundo (INSTITUTE, 2019). Em sua gênese, apresenta relações fortes com os hábitos de vida e também fatores genéticos hereditários (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019). Além disso, apresenta uma cascata de desenvolvimento bem documentada, com mutações em genes chave para a progressão tumoral, até chegada em estádios de invasão de outros tecidos (ASGHARI; ABAZARI; BOKHARAEI; ALEAGHA *et al.*, 2018). Neste estudo avaliamos comparativamente os SNPs presentes em 1 amostra de tecido colônico normal, comparando-a com 5 amostras de tecido colônico canceroso de pacientes com CCR em estágio inicial. Utilizando análises integradas de bases de dados (GWAS, STRING, NCBI SNPDB) encontramos 2 SNPs (rs11168036 e rs9859260) ligados a vias de sinalização dos genes HBEGF e TRFC, respectivamente. Esses SNPs estavam ausentes no tecido normal e alterados nos tecidos tumorais, em todas as amostras tumorais ou em pelo menos 1 amostra tumoral.

O polimorfismo rs11168036 consiste na mudança do nucleotídeo timina (T) por guanina (G), na região citogenética 5q31.3 (NIH, 2020b). Esse polimorfismo ainda é pouco estudado na literatura, tendo sido relacionado à doença de Alzheimer em estudos de associação genômica ampla (JUN; CHUNG; MEZ; BARBER *et al.*, 2017; ZHANG; HU; ZHANG; ZHE *et al.*, 2019). No presente estudo, o SNP apresentou-se em genótipos alterados em todas as amostras de pacientes com câncer colorretal, sendo em homozigose, heterozigose ou adição. Dessa forma, sua presença ampla nestes tecidos pode sugerir relação com esta neoplasia.

O SNP rs11168036 foi ligado ao gene HBEGF em nossas análises. Este gene pertencente à família de fatores de crescimento epidermal (EGF) (NIH, 2020a) tem potencial mitógeno. O HBEGF demonstrou estimular o crescimento de uma variedade de células e estar envolvido na proliferação estromal (ONGUSAHA; KWAK; ZWIBLE; MACIP *et al.*, 2004). Assim, apesar da relação com os SNPs está ligado somente às doenças como o Alzheimer em estudos de associação genômica ampla, a alteração documentada em todos os tecidos tumorais mostra-se potencialmente para marcadores de cânceres em estágio inicial e que estejam em desenvolvimento utilizando prioritariamente a via de sinalização deste gene.

Dentre as interações demonstradas pela base STRING, destaca-se a interação entre as proteínas HBEGF e KRAS. A proteína KRAS é uma GTPase da família *Ras*, que desempenha importante papel na regulação da proliferação celular e na promoção de eventos oncogênicos, induzindo o silenciamento da transcrição de genes supressores de tumor em células do câncer colorretal (STRING, 2020). Os resultados do presente estudo demonstraram que ambas as proteínas interagem por meio de vias de sinalização celular, como as vias que envolvem fatores de crescimento (ERBB2 e ERBB4), além da via de proteoglicanos no câncer. Apesar das alterações funcionais que o SNP rs11168036 pode causar ao gene e à proteína HBEGF serem ainda pouco estudadas, pode-se sugerir que, de forma semelhante ao KRAS, essa alteração gere impacto nas vias de proliferação celular, estimulando a carcinogênese.

Limitações e perspectivas futuras

Quando avaliamos as limitações de nosso estudo podemos elencar que a avaliação *in silico* realizada pode não ser suficiente para mostrar a relação dos SNPs com os genes evidenciados. Porém, quando buscamos bases de dados e avaliações robustas destas para gerar nossas relações foi necessário tomada de decisões para dados que obtivessem maior nível de evidência na tentativa de minimizar este ponto.

Além disso, o uso de várias bases integradas e a somatória de análises consecutivas podem gerar vieses nos resultados deste trabalho. O que deverá ser minimizado pela validação destes dados por meio de técnicas como RT-PCR posteriormente a este estudo na tentativa de demonstrar as relações entre os SNPs e os genes HBEGF e TNFC.

Conclusão

Em nossa avaliação é possível sugerir que alterações genéticas como os SNPs rs11168036 e rs9859260 podem apresentar potenciais marcadores genéticos para cânceres de cólon e reto em fases iniciais da carcinogênese. Assim, mais estudos que possam elucidar e validar a relação destes marcadores genéticos e sua relação com as vias do câncer colorretal não necessários.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AMERICAN CANCER SOCIETY, A. Oncogenes and tumor suppressor genes. 2019. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html> >. Acesso em: 03 de maio.
- ANDRÉS-LEÓN, E. N.-T., ROCÍO; ROJAS, ANA M miARma-Seq: a comprehensive tool for MIRNA, mRNA and circRNA analysis. v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016. ISSN 2045-2322.
- AMIRKHAH R, FARAZMAND A, IRFAN-MAQSOOD M, WOLKENHAUER O, SCHMITZ U. The role of microRNAs in the resistance to colorectal cancer treatments. **Cell Mol Biol**. 2015;61(6):17-23.
- ARNOLD M, SIERRA MS, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**. 2017;66(4):683-691.
- BAKHTIYARI, S. et al. siRNA therapeutics in the treatment of diseases. **Therapeutic delivery**, v. 4, n. 1, p. 45-57, 2013. ISSN 2041-5990.
- BLOCK, K. I.; BLOCK, P. B.; GYLLENHAAL, C. Integrative Treatment for Colorectal Cancer: A Comprehensive Approach. **J Altern Complement Med**, v. 24, n. 9-10, p. 890-901, Sep/Oct 2018. ISSN 1075-5535.
- BOQUETT, J. A.; FERREIRA, R. J. Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família proto-oncogênica Ras. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 201-211, 2010. ISSN 1679-0367.
- BRAY, F. 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, 2018. ISSN 0007-9235.
- BRIERLEY, J. D. **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2017. ISBN 1119263573.
- BUNIELLO, A. et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. 1362-4962 (Electronic), p. D1005-D1012, Jan 8 2019. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30445434> >.
- CANCER GENOME ATLAS, N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330-7, Jul 18 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22810696> >.
- CARTER, J. V. et al. Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 116, n. 6, p. 762, 2017. ISSN 1532-1827.

CANCER GENOME ATLAS N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**. Jul 18 2012;487(7407):330-337.

CHALBATANI, G. M. et al. Biological function and molecular mechanism of piRNA in cancer. **Practical laboratory medicine**, p. e00113, 2018. ISSN 2352-5517.

CHANDRAN, U. R. et al. TCGA Expedition: A Data Acquisition and Management System for TCGA Data. **PLoS one**, v. 11, n. 10, p. e0165395-e0165395, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27788220> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5082933/> >.

CHEN, L. L. Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 9, p. 761-772, Sep 2016. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499234> >.

COLAPRICO, A. et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, 2016.

COLAPRICO, A. S., TIAGO C; OLSEN, CATHARINA ; GAROFANO, LUCIANO; CAVA, CLAUDIA; GAROLINI, DAVIDE; SABEDOT, THAIS S; MALTA, TATHIANE M; PAGNOTTA, STEFANO M; CASTIGLIONI, ISABELLA TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. v. 44, n. 8, p. e71-e71, 2016. ISSN 1362-4962.

COOPER, G. M. Tumor Suppressor Genes. In: (Ed.). **The Cell: A Molecular Approach**. . 2nd, 2000.

CUMPSTON MS, MCKENZIE JE, WELCH VA, BRENNAN SE. Strengthening systematic reviews in public health: guidance in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, 2nd edition. **J Public Health** (Oxf). 2022

DE ROSA, M. et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). **Oncol Rep**, v. 34, n. 3, p. 1087-96, Sep 2015. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335x.

DENG H, WANG JM, LI M, et al. Long non-coding RNAs: New biomarkers for prognosis and diagnosis of colon cancer. **Tumour Biol**. Jun 2017;39(6):1010428317706332.

DIENSTMANN R, VERMEULEN L, GUINNEY J, KOPETZ S, TEJPAR S, TABERNERO J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nat Rev Cancer**. 2017 Feb;17(2):79-92. doi: 10.1038/nrc.2016.126. Epub 2017 Jan 4. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2017 Mar 23;17(4):268.

DIAMANTOPOULOS, M. A.; TSIAKANIKAS, P.; SCORILAS, A. Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. **Ann Transl Med**, v. 6, n. 12, p. 241, Jun 2018. ISSN 2305-5839 (Print) 2305-5839 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30069443> >.

- DU, W. W. et al. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. **Theranostics**, v. 7, n. 17, p. 4183, 2017.
- EISENHARDT, M. Avaliação das características clínicas e epidemiológicas e sobrevida global de pacientes portadores de câncer colorretal. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 4, p. 112-116, 2013. ISSN 2238-3360.
- ERSTAD, D. J.; TUMUSIIME, G.; CUSACK, J. C. Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer: implications for the clinical surgeon. **Annals of surgical oncology**, v. 22, n. 11, p. 3433-3450, 2015. ISSN 1068-9265.
- EGGER M, SMITH GD, SCHNEIDER M, MINDER C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Bmj*. 1997;315(7109):629-634.
- ERSTAD DJ, TUMUSIIME G, CUSACK JC. Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer: implications for the clinical surgeon. **Ann Surg Oncol**. 2015;22(11):3433-3450.
- FAKIH, M. M. KRAS mutation screening in colorectal cancer: from paper to practice. **Clinical colorectal cancer**, v. 9, n. 1, p. 22-30, 2010. ISSN 1533-0028.
- FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer**, 2013. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr> >. Acesso em: 09/09/2017.
- GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350, 2015.
- GU X, JIN R, MAO X, WANG J, YUAN J, ZHAO G. Prognostic value of miRNA-181a/b in colorectal cancer: a meta-analysis. **Biomark Med**. 2018;12(3):299-308.
- GUYATT GH, OXMAN AD, VIST G, et al. GRADE guidelines: 4. Rating the quality of evidence—study limitations (risk of bias). **J Clin Epidemiol**. 2011;64(4):407-415.
- HAMMOND SM. An overview of microRNAs. **Adv Drug Deliv Rev**. 2015;87:3-14.
- HUANG X, LIN J, DEMNER-FUSHMAN D. Evaluation of PICO as a Knowledge Representation for Clinical Questions. **AMIA Annu Symp Proc**. 2006;2006:359-363.
- HUMMEL R, HUSSEY DJ, HAIER J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. **Eur J Cancer**. 2010;46(2):298-311.
- IORIO A, SPENCER FA, FALAVIGNA M, et al. Use of GRADE for assessment of evidence about prognosis: rating confidence in estimates of event rates in broad categories of patients. **bmj**. 2015;350:h870.
- HOMBACH, S.; KRETZ, M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. **Adv Exp Med Biol**, v. 937, p. 3-17, 2016. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573892> >.

HONG, E. L. et al. Principles of metadata organization at the ENCODE data coordination center. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2016, p. baw001, 2016. ISSN 1758-0463. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26980513> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4792520/> >.

HSU, S.-D. et al. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA–target interactions. v. 39, n. suppl_1, p. D163-D169, 2011. ISSN 0305-1048.

INCA, I. N. D. C. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**: INCA. Rio de Janeiro 2018.

_____. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2023.

KARAMCHANDANI, D. M. et al. Challenges with colorectal cancer staging: results of an international study. **Modern Pathology**, p. 1-11, 2019. ISSN 1530-0285.

KIM SW. [The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer]. **Korean J Gastroenterol**. 2017 Apr 25;69(4):206-211.

KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 393-407, Jan 25 2018. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29373828> >.

KOZOMARA, A. G.-J., SAM miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. v. 42, n. D1, p. D68-D73, 2014. ISSN 1362-4962.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597, 2010. ISSN 1471-0064.

KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15065, Nov 5 2015. ISSN 2056-676x.

LAM, K. et al. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1866, n. 1, p. 106-120, 2016. ISSN 0304-419X.

LI, R. et al. CircRNA: a rising star in gastric cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-20, 2019. ISSN 1420-682X.

LIEVRE, A. et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. **Cancer research**, v. 66, n. 8, p. 3992-3995, 2006. ISSN 0008-5472.

LIN, C.-P.; HE, L. Noncoding RNAs in Cancer Development. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. 163-184, 2017. ISSN 2472-3428.

- LIU, J. J. et al. Metabolic syndrome and colorectal cancer: is hyperinsulinemia/insulin receptor-mediated angiogenesis a critical process? **Journal of geriatric oncology**, v. 5, n. 1, p. 40-48, 2014. ISSN 1879-4068.
- LIU, Y. et al. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 123, 2019. ISSN 1476-4598.
- LUCAS, C.; BARNICH, N.; NGUYEN, H. T. T. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 20 2017. ISSN 1422-0067.
- MA, L.; BAJIC, V. B.; ZHANG, Z. On the classification of long non-coding RNAs. **RNA Biol**, v. 10, n. 6, p. 925-33, Jun 2013. ISSN 1555-8584 (Electronic) 1547-6286 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696037> >.
- MACARTHUR, J. et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. 1362-4962 (Electronic), p. D896-D901, Jan 4 2017. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899670> >.
- MAGNO, R.; MAIA, A. T. gwasrapidd: an R package to query, download and wrangle GWAS catalog data. **Bioinformatics**, v. 36, n. 1367-4811 (Electronic), p. 649-650, Jan 15 2020. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31373609> >.
- MAKAROVA, J. A. et al. New functions of small nucleolar RNAs. **Biochemistry (Mosc)**, v. 78, n. 6, p. 638-50, Jun 2013. ISSN 1608-3040 (Electronic) 0006-2979 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23980890> >.
- MARMOL, I. et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, Jan 19 2017. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106826> >.
- MÁRMOL, I. et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, Jan 19 2017. ISSN 1422-0067.
- MENG, S. et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 94, 2017. ISSN 1476-4598.
- NAGTEGAAL, I. D. et al. Tumor deposits in colorectal cancer: improving the value of modern staging-a systematic review and meta-analysis. 2017.
- NGUYEN, H. T.; DUONG, H. Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. **Oncology Letters**, 2018.
- NIKAM, R. R.; GORE, K. R. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. **Nucleic acid therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 209-224, 2018. ISSN 2159-3337.
- OLIVEIRA, T. R.; FORTES, R. C. Hábitos alimentares de pacientes com câncer colorretal. **J Health Sci Inst**, v. 31, n. 1, p. 59-64, 2013.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A.; CARVALHO, N. S. D. Biologia molecular: aspectos básicos da genética: parte I. **Femina**, v. 38, n. 11, p. 575-582, 2010. ISSN 0100-7254.

PIÑEROS, M. et al. Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 2, p. e103-e111, 2019. ISSN 1470-2045.

QU, H. et al. Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 5, p. 1117-1125, 2011.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. J. B. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010. ISSN 1367-4803.

ROSAS, M. S. et al. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243-265, 2013. ISSN 1984-6835.

RUIZ, R. B.; HERNÁNDEZ, P. S. Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, v. 77, n. 3, p. 202-208, 2014. ISSN 0378-5122.

SANDHU, M. S.; WHITE, I. R.; MCPHERSON, K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 10, n. 5, p. 439-446, 2001. ISSN 1055-9965.

SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLAG, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295-308, 2007. ISSN 1474-1768.

SEER. Cancer Stat Facts: Colon and Rectum Cancer. **National Cancer Institute**. 2017. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.

SCHÜTZE, N. siRNA technology. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 213, n. 2, p. 115-119, 2004. ISSN 0303-7207.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 104-117, 2014. ISSN 1542-4863.

SINGH, A.; TRIVEDI, P.; JAIN, N. K. Advances in siRNA delivery in cancer therapy. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 274-283, 2018. ISSN 2169-1401.

SLATTERY, M. L. et al. MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression. **Carcinogenesis**, p. bgv249, 2016. ISSN 0143-3334.

SOUZA, G. D. D. et al. MÉTODOS DE IMAGEM NO ESTADIAMENTO PRÉ E PÓS OPERATÓRIOS DO CÂNCER COLORRETAL. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 31, n. 2, 2018. ISSN 0102-6720.

STINTZING, S. et al. Predictive and prognostic markers in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). **Hematology/Oncology Clinics**, v. 29, n. 1, p. 43-60, 2015. ISSN 0889-8588.

SUGIHARA, K. [Overview of treatment strategy of Stage IV colorectal cancer]. **Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi**, v. 114, n. 7, p. 1195-1200, 2017. ISSN 0446-6586 (Print) 0446-6586.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic acids research**, p. gkw937, 2016. ISSN 0305-1048.

THOMAS, J. et al. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 12, p. 28063-76, Nov 25 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26602923> >.

TIAN, T.; WANG, J.; ZHOU, X. A review: microRNA detection methods. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2226-2238, 2015.

WAN, X.-B. et al. Relationships among KRAS mutation status, expression of RAS pathway signaling molecules, and clinicopathological features and prognosis of patients with colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 7, p. 808, 2019.

WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, 2018. ISSN 2041-1723.

XING, Y. H.; CHEN, L. L. Processing and roles of snoRNA-ended long noncoding RNAs. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 53, n. 6, p. 596-606, Dec 2018. ISSN 1549-7798 (Electronic) 1040-9238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30252509> >.

YATES, L. A.; NORBURY, C. J.; GILBERT, R. J. The long and short of microRNA. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 516-519, 2013. ISSN 0092-8674.

ZHANG, C. et al. Genome-wide screening and cohorts validation identifying novel lncRNAs as prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma. LID - 10.1002/jcb.29478 [doi]. n. 1097-4644 (Electronic), 2019.

ZHAO, K. A.-O. H. O. O. X. et al. A prognostic five long-noncoding RNA signature for patients with rectal cancer. LID - 10.1002/jcb.29549 [doi]. n. 1097-4644 (Electronic), 2019.

ZHAO, Y.; SCHAAFSMA, E.; CHENG, C. Applications of ENCODE data to Systematic Analyses via Data Integration. **Current opinion in systems biology**, v. 11, p. 57-64, 2018. ISSN 2452-3100. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31011690> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6474416/> >.

ZHARIKOVA, A.; MIRONOV, A. piRNAs: biology and bioinformatics. **Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 69-76, 2016. ISSN 0026-8933.

Chan JJ, Tay Y. Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5).

Chu PC, Lin PC, Wu HY, Lin KT, Wu C, Bekaii-Saab T, et al. Mutant KRAS promotes liver metastasis of colorectal cancer, in part, by upregulating the MEK-Sp1-DNMT1-miR-137-YB-1-IGF-IR signaling pathway. *Oncogene*. 2018;37(25):3440-55.

Cicenas J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, Tarvydas R, Staniute G, Kalyan K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Medical oncology* (Northwood, London, England). 2017;34(2):26.

Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Research*. 2016.

Cui F, Wang S, Lao I, Zhou C, Kong H, Bayaxi N, et al. miR-375 inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer via targeting SP1 and regulating EMT-associated genes. *Oncology reports*. 2016;36(1):487-93.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46.
Hong CC, Chen PS, Chiou J, Chiu CF, Yang CY, Hsiao M, et al. miR326 maturation is crucial for VEGF-C-driven cortactin expression and esophageal cancer progression. *Cancer research*. 2014;74(21):6280-90.

Hsu S-D, Lin F-M, Wu W-Y, Liang C, Huang W-C, Chan W-L, et al. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA–target interactions. 2011;39(suppl_1):D163-D9.

Ito Y, Osakabe M, Niinuma T, Uesugi N, Sugimoto R, Yanagawa N, Otsuka K, Sasaki A, Matsumoto T, Suzuki H, Sugai T. Genome-wide analysis of mRNA and microRNA expression in colorectal cancer and adjacent normal mucosa. *J Pathol Clin Res*. 2022 Jul;8(4):313-326.

JW1 Y, JS L, XX H. The emerging role of miR-375 in cancer. *Europe PMC*. 2013.
Kang K, Zhang J, Zhang X, Chen Z. MicroRNA-326 inhibits melanoma progression by targeting KRAS and suppressing the AKT and ERK signalling pathways. *Oncology reports*. 2018;39(1):401-10.

Kather JN, Halama N, Jaeger D. Genomics and emerging biomarkers for immunotherapy of colorectal cancer. *Seminars in cancer biology*. 2018;52(Pt 2):189-97.

Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(12):713-32.

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162.

LAM K, PAN K, LINNEKAMP JF, MEDEMA JP, KANDIMALLA R. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**. 2016;1866(1):106-120.

Li Z, Liu J, Chen H, Zhang Y, Shi H, Huang L, et al. Ferritin Light Chain (FTL) competes with long noncoding RNA Linc00467 for miR-133b binding site to regulate chemoresistance and metastasis of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2020;41(4):467-77.

Liang X, Li Z, Men Q, Li Y, Li H, Chong T. miR-326 functions as a tumor suppressor in human prostatic carcinoma by targeting Mucin1. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;108:574-83.

Liu XH, Wang J, Dong YH. The inhibitory effect of miR-375 targeting sp1 in colorectal cancer cell proliferation. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018;22(2):405-11.

Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(4):1202-7.

Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1).

MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS med**. Jul 21 2009;6(7):e1000097.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer 2019 [cited 2019]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.

Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology Letters*. 2018.

PAN C, YAN X, LI H, ET AL. Systematic literature review and clinical validation of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. **Oncotarget**. 2017;8(40):68317.

POMPEU, Rafael; MAGALHÃES, Leandro; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Ândrea; VIDAL, Amanda; ARA ÚJO, Gilderlanio S.. Modelagem de Redes Regulatórias para a Descoberta de Novos Biomarcadores de Doenças Complexas. *In: BRAZILIAN E-SCIENCE WORKSHOP (BRESOI)*, 13. , 2019, Belém. **Anais [...]**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Computação, 2019 . ISSN 2763-8774. DOI: <https://doi.org/10.5753/bresoi.2019.10026>.

Qiu T, Zhou X, Wang J, Du Y, Xu J, Huang Z, et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer. *FEBS letters*. 2014;588(7):1168-77.

STINTZING S, STREMITZER S, SEBIO A, LENZ H-J. Predictive and prognostic markers in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). **Hematol Oncol Clin N Am**. 2015;29(1):43-60.

STROUP DF, BERLIN JA, MORTON SC, ET AL. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. **Jama**. 2000;283(15):2008-2012.

Sun C, Huang C, Li S, Yang C, Xi Y, Wang L, et al. Hsa-miR-326 targets CCND1 and inhibits non-small cell lung cancer development. *Oncotarget*. 2016;7(7):8341-59.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4.

Szkarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-d13.

TANG SW, ZHANG Y, TAO BL, YANG ZR, SUN F, ZHAN SY. [Risk of bias assessment: (7) Assessing Bias in Studies of Prognostic Factors]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**. 2018 Jul 10;39(7):1003-1008.

THOMAS J, OHTSUKA M, PICHLER M, LING H. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**. Nov 25 2015;16(12):28063-28076.

Thomas J, Ohtsuka M, Pichler M, Ling H. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):28063-76.

TIBERIO P, CALLARI M, ANGELONI V, DAIDONE MG, APPIERTO V. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. **Biomed Res Int**. 2015;2015:731479.

TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, FLESHMAN J, BOLAND CR, GOEL A. MicroRNAs as potential liquid biopsy biomarkers in colorectal Cancer: A systematic review. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**. 2018; 1870 (2), 274-282.

VALIHRACH L, ANDROVIC P, KUBISTA M. Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. **Mol Aspects Med**. 2020 Apr;72:100825. doi: 10.1016/j.mam.2019.10.002. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31635843.

WANG H. MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**. 2020 Jul 28;21(15):5353. doi: 10.3390/ijms21155353. PMID: 32731413; PMCID: PMC7432330.

Wang R, Xu J, Xu J, Zhu W, Qiu T, Li J, et al. MiR-326/Sp1/KLF3: A novel regulatory axis in lung cancer progression. *Cell Proliferation*. 2018.

Wentzensen N, Wilz B, Findeisen P, Wagner R, Dippold W, Knebel MV, et al. Identification of differentially expressed genes in colorectal adenoma compared to normal tissue by suppression subtractive hybridization. *International journal of oncology*. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. GCO, Cancer tomorrow: estimated number of incident cases from 2018 to 2040, colon, both sexes, all age 2019 [cited 2019. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.

Xie B, Gong N, Guo Y, Hu G. MicroRNA-133b expression inversely correlates with MET and can serve as an optimum predictive biomarker for patients of colorectal cancer. *Transl Cancer Res.* 2021 Jan;10(1):57-64.

Xu X, Chen X, Xu M, Liu X, Pan B, Qin J, et al. miR-375-3p suppresses tumorigenesis and partially reverses chemoresistance by targeting YAP1 and SP1 in colorectal cancer cells. *Aging (Albany NY).* 2019;11(18):7357-85.

Zamani M, Hosseini SV, Mokarram P. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals.* 2018;23(2):105-14.

ZHENG Q, CHEN C, GUAN H, et al. Prognostic role of MicroRNAs in human gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. ***Oncotarget.*** 2015;5:46611-46623.

Zhou J, Lv L, Lin C, Hu G, Guo Y, Wu M, et al. Combinational treatment with microRNA-133b and cetuximab has increased inhibitory effects on the growth and invasion of colorectal cancer cells by regulating EGFR. *Molecular medicine reports.* 2015;12(4):5407-14.

INCA, I.N.d.C., *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil 2023.*

Wu, S., et al., *Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors.* *Nature communications,* 2018. **9**(1): p. 3490.

Oliveira, T.R. and R.C. Fortes, *Hábitos alimentares de pacientes com câncer colorretal.* *J Health Sci Inst,* 2013. **31**(1): p. 59-64.

Ruiz, R.B. and P.S. Hernández, *Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence.* *Maturitas,* 2014. **77**(3): p. 202-208.

Cooper, G.M., *Tumor Suppressor Genes,* in *The Cell: A Molecular Approach.* . 2000.

Piazza, M.J., A.A. Urbanetz, and N.S.d. Carvalho, *Biologia molecular: aspectos básicos da genética: parte I.* *Femina,* 2010. **38**(11): p. 575-582.

American Cancer Society, A. *Oncogenes and tumor suppressor genes.* 2019 [cited 2019 03 de maio]; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>.

Bray, F., 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,* 2018. **68**(6): p. 394-424.

INCA, I.N.d.C., *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil 2023:* Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

Eisenhardt, M., *Avaliação das características clínicas e epidemiológicas e sobrevida global de pacientes portadores de câncer colorretal*. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, 2013. **3**(4): p. 112-116.

Rosas, M.S., et al., *Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental*. Revista Virtual de Química, 2013. **5**(2): p. 243-265.

Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020 May;70(3):145-164. doi: 10.3322/caac.21601.

Slattery, M.L., et al., *MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression*. Carcinogenesis, 2016: p. bgv249.

Lucas, C., N. Barnich, and H.T.T. Nguyen, *Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).

Mármol, I., et al., *Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(1).

Liu, J.J., et al., *Metabolic syndrome and colorectal cancer: is hyperinsulinemia/insulin receptor-mediated angiogenesis a critical process?* Journal of geriatric oncology, 2014. **5**(1): p. 40-48.

Sandhu, M.S., I.R. White, and K. McPherson, *Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2001. **10**(5): p. 439-446.

INCA, I.N.d.C., *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. 2018, INCA. Rio de Janeiro.

Piñeros, M., et al., *Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information*. The Lancet Oncology, 2019. **20**(2): p. e103-e111.

Nagtegaal, I.D., et al., *Tumor deposits in colorectal cancer: improving the value of modern staging-a systematic review and meta-analysis*. 2017.

SOUZA, G.D.d., et al., *MÉTODOS DE IMAGEM NO ESTADIAMENTO PRÉ E PÓS OPERATÓRIOS DO CÂNCER COLORRETAL*. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo), 2018. **31**(2).

Karamchandani, D.M., et al., *Challenges with colorectal cancer staging: results of an international study*. Modern Pathology, 2019: p. 1-11.

Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. Lancet. 2019 Oct 19;394(10207):1467-1480.

Block, K.I., P.B. Block, and C. Gyllenhaal, *Integrative Treatment for Colorectal Cancer: A Comprehensive Approach*. J Altern Complement Med, 2018. **24**(9-10): p. 890-901.

De Rosa, M., et al., *Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review)*. Oncol Rep, 2015. **34**(3): p. 1087-96.

Sugihara, K., [*Overview of treatment strategy of Stage IV colorectal cancer*]. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi, 2017. **114**(7): p. 1195-1200.

Brierley, J.D., *TNM classification of malignant tumours*. 2017: John Wiley & Sons.

Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 330-7.

Guinney, J., et al., *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. Nature medicine, 2015. **21**(11): p. 1350.

Lam, K., et al., *DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2016. **1866**(1): p. 106-120.

Thomas, J., et al., *MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(12): p. 28063-76.

Stintzing, S., et al., *Predictive and prognostic markers in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC)*. Hematology/Oncology Clinics, 2015. **29**(1): p. 43-60.

Erstad, D.J., G. Tumusiime, and J.C. Cusack, *Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer: implications for the clinical surgeon*. Annals of surgical oncology, 2015. **22**(11): p. 3433-3450.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249.

Zhao Y, Song Y, Yao L, Song G, Teng C. Circulating microRNAs: Promising Biomarkers Involved in Several Cancers and Other Diseases. DNA Cell Biol. 2017 Feb;36(2):77-94.

Wan, X.-B., et al., *Relationships among KRAS mutation status, expression of RAS pathway signaling molecules, and clinicopathological features and prognosis of patients with colorectal cancer*. World journal of gastroenterology, 2019. **25**(7): p. 808.

Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(4): p. 295-308.

Boquett, J.A. and R.J. Ferreira, *Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família proto-oncogênica Ras*. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 2010. **31**(2): p. 201-211.

Fakih, M.M., *KRAS mutation screening in colorectal cancer: from paper to practice*. Clinical colorectal cancer, 2010. **9**(1): p. 22-30.

Lievre, A., et al., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. *Cancer research*, 2006. **66**(8): p. 3992-3995.

Marmol, I., et al., *Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(1).

Diamantopoulos, M.A., P. Tsiakanikas, and A. Scorilas, *Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer*. *Ann Transl Med*, 2018. **6**(12): p. 241.

Hombach, S. and M. Kretz, *Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **937**: p. 3-17.

Lin, C.-P. and L. He, *Noncoding RNAs in Cancer Development*. *Annual Review of Cancer Biology*, 2017. **1**(1): p. 163-184.

Zhao, K.A.-O.h.o.o.X., et al., *A prognostic five long-noncoding RNA signature for patients with rectal cancer*. *LID - 10.1002/jcb.29549 [doi]*. 2019(1097-4644 (Electronic)).

Zhang, C., et al., *Genome-wide screening and cohorts validation identifying novel lncRNAs as prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma*. *LID - 10.1002/jcb.29478 [doi]*. 2019(1097-4644 (Electronic)).

Carter, J.V., et al., *Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis*. *British journal of cancer*, 2017. **116**(6): p. 762.

Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. *Nature Reviews Genetics*, 2010. **11**(9): p. 597.

Li, R., et al., *CircRNA: a rising star in gastric cancer*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019: p. 1-20.

Tian, T., J. Wang, and X. Zhou, *A review: microRNA detection methods*. *Organic & biomolecular chemistry*, 2015. **13**(8): p. 2226-2238.

Yates, L.A., C.J. Norbury, and R.J. Gilbert, *The long and short of microRNA*. *Cell*, 2013. **153**(3): p. 516-519.

Schütze, N., *siRNA technology*. *Molecular and cellular endocrinology*, 2004. **213**(2): p. 115-119.

Nikam, R.R. and K.R. Gore, *Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery*. *Nucleic acid therapeutics*, 2018. **28**(4): p. 209-224.

Singh, A., P. Trivedi, and N.K. Jain, *Advances in siRNA delivery in cancer therapy*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 2018. **46**(2): p. 274-283.

Bakhtiyari, S., et al., *siRNA therapeutics in the treatment of diseases*. *Therapeutic delivery*, 2013. **4**(1): p. 45-57.

- Zharikova, A. and A. Mironov, *piRNAs: biology and bioinformatics*. Molecular Biology, 2016. **50**(1): p. 69-76.
- Chalbatani, G.M., et al., *Biological function and molecular mechanism of piRNA in cancer*. Practical laboratory medicine, 2018: p. e00113.
- Liu, Y., et al., *The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer*. Molecular cancer, 2019. **18**(1): p. 123.
- Xing, Y.H. and L.L. Chen, *Processing and roles of snoRNA-ended long noncoding RNAs*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018. **53**(6): p. 596-606.
- Makarova, J.A., et al., *New functions of small nucleolar RNAs*. Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(6): p. 638-50.
- Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
- Chen, L.L., *Linking Long Noncoding RNA Localization and Function*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(9): p. 761-772
- Kopp, F. and J.T. Mendell, *Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs*. Cell, 2018. **172**(3): p. 393-407.
- Meng, S., et al., *CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer*. Molecular cancer, 2017. **16**(1): p. 94.
- Du, W.W., et al., *Identifying and characterizing circRNA-protein interaction*. Theranostics, 2017. **7**(17): p. 4183.
- Chandran, U.R., et al., *TCGA Expedition: A Data Acquisition and Management System for TCGA Data*. PloS one, 2016. **11**(10): p. e0165395-e0165395.
- Hong, E.L., et al., *Principles of metadata organization at the ENCODE data coordination center*. Database : the journal of biological databases and curation, 2016. **2016**: p. baw001.
- Zhao, Y., E. Schaafsma, and C. Cheng, *Applications of ENCODE data to Systematic Analyses via Data Integration*. Current opinion in systems biology, 2018. **11**: p. 57-64.
- MacArthur, J., et al., *The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog)*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(1362-4962 (Electronic)): p. D896-D901.
- Magno, R. and A.T. Maia, *gwasrapid: an R package to query, download and wrangle GWAS catalog data*. Bioinformatics, 2020. **36**(1367-4811 (Electronic)): p. 649-650.
- Buniello, A., et al., *The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(1362-4962 (Electronic)): p. D1005-D1012.

Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, Doncheva NT, Legeay M, Fang T, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D605-D612.

Nguyen, H.T. and H.Q. Duong, *The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy.* *Oncology Letters*, 2018.

Colaprico, A., et al., *TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data.* *Nucleic Acids Research*, 2016.

Colaprico, A.S., Tiago C; Olsen, Catharina ; Garofano, Luciano; Cava, Claudia; Garolini, Davide; Sabedot, Thais S; Malta, Tathiane M; Pagnotta, Stefano M; Castiglioni, Isabella *TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data.* 2016. **44**(8): p. e71-e71.

Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K.J.B. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.* 2010. **26**(1): p. 139-140.

Andrés-León, E.N.-T., Rocío; Rojas, Ana M *miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis.* 2016. **6**(1): p. 1-8.

Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W, Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D296-D302.

Kozomara, A.G.-J., Sam *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.* 2014. **42**(D1): p. D68-D73.

Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2012;143(3):844-57.

Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American journal of gastroenterology.* 2001;96(10):2992-3003.

Shin A, Joo J, Yang H-R, Bak J, Park Y, Kim J, et al. Risk prediction model for colorectal cancer: National Health Insurance Corporation study, Korea. *PloS one.* 2014;9(2):e88079.

Nishihara R, Glass K, Mima K, Hamada T, Nowak JA, Qian ZR, et al. Biomarker correlation network in colorectal carcinoma by tumor anatomic location. *BMC bioinformatics.* 2017;18(1):304.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine.* 2015;21(11):1350.

- Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(12):713-
- Zhang F, Zhang Y, Zhao W, Deng K, Wang Z, Yang C, et al. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review. *Oncotarget*. 2017;8(21):35460-72.
- Wan X-B, Wang A-Q, Cao J, Dong Z-C, Li N, Yang S, et al. Relationships among KRAS mutation status, expression of RAS pathway signaling molecules, and clinicopathological features and prognosis of patients with colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2019;25(7):808.
- Liao C, Huang X, Gong Y, Lin Q. Discovery of core genes in colorectal cancer by weighted gene co-expression network analysis. *Oncol Lett*. 2019;18(3):3137-49.
- Li LX, Lam IH, Liang FF, Yi SP, Ye LF, Wang JT, et al. MiR-198 affects the proliferation and apoptosis of colorectal cancer through regulation of ADAM28/JAK-STAT signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2019;23(4):1487-93.
- Wang M, Wang J, Kong X, Chen H, Wang Y, Qin M, et al. MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Scientific reports*. 2014;4:6145.
- Zhu Y, Peng Q, Lin Y, Zou L, Shen P, Chen F, et al. Identification of biomarker microRNAs for predicting the response of colorectal cancer to neoadjuvant chemoradiotherapy based on microRNA regulatory network. *Oncotarget*. 2017;8(2):2233-48.
- Murakami T, Kikuchi H, Ishimatsu H, Iino I, Hirotsu A, Matsumoto T, et al. Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis. *British journal of cancer*. 2017;117(9):1360-70.
- Lin G, Sheng H, Xie H, Zheng Q, Shen Y, Shi G, et al. circLPAR1 is a novel biomarker of prognosis for muscle-invasive bladder cancer with invasion and metastasis by miR-762. *Oncol Lett*. 2019;17(3):3537-47.
- Liu T, Lu Q, Liu J, Xie S, Feng B, Zhu W, et al. Circular RNA FAM114A2 suppresses progression of bladder cancer via regulating Δ NP63 by sponging miR-762. *Cell Death Dis*. 2020;11(1):47-.
- Shi Y, Jia Y, Zhao W, Zhou L, Xie X, Tong Z. Histone deacetylase inhibitors alter the expression of molecular markers in breast cancer cells via microRNAs. *International journal of molecular medicine*. 2018;42(1):435-42.
- Li Y, Huang R, Wang L, Hao J, Zhang Q, Ling R, et al. microRNA-762 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by targeting IRF7 expression. *Cell Prolif*. 2015;48(6):643-9.
- Lönnroth C, Andersson M, Astring AG, Nordgren S, Lundholm K. Preoperative low dose NSAID treatment influences the genes for stemness, growth, invasion and metastasis in colorectal cancer. *International journal of oncology*. 2014;45(6):2208-20.

Chu D, Zheng J, Li J, Li Y, Zhang J, Zhao Q, et al. MicroRNA-630 is a prognostic marker for patients with colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(10):9787-92.

Zhang L, Feng G, Zhang X, Ding Y, Wang X. microRNA-630 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in the HCT116 human colorectal cancer cell line. *Molecular medicine reports*. 2017;16(4):4843-8.

Millino C, Maretto I, Pacchioni B, Digito M, De Paoli A, Canzonieri V, et al. Gene and MicroRNA Expression Are Predictive of Tumor Response in Rectal Adenocarcinoma Patients Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. *Journal of cellular physiology*. 2017;232(2):426-35.

Hamfjord J, Stangeland AM, Hughes T, Skrede ML, Tveit KM, Ikdahl T, et al. Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PloS one*. 2012;7(4):e34150-e.

Slattery ML, Herrick JS, Pellatt DF, Stevens JR, Mullany LE, Wolff E, et al. MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression. *Carcinogenesis*. 2016;37(3):245-61.

Mullany LE, Herrick JS, Sakoda LC, Samowitz W, Stevens JR, Wolff RK, et al. MicroRNA-messenger RNA interactions involving JAK-STAT signaling genes in colorectal cancer. *Genes Cancer*. 2018;9(5-6):232-46.

Slattery ML, Mullany LE, Sakoda LC, Wolff RK, Samowitz WS, Herrick JS. The MAPK-Signaling Pathway in Colorectal Cancer: Dysregulated Genes and Their Association With MicroRNAs. *Cancer Inform*. 2018;17:1176935118766522-.

Paredes J, Ji P, Lacombe JF, Shroyer KR, Martello LA, Williams JL. Establishment of three novel cell lines derived from African American patients with colorectal carcinoma: A unique tool for assessing racial health disparity. *Int J Oncol*. 2018 Oct;53(4):1516-1528.

Han Y, Zhao Q, Zhou J, Shi R. miR-429 mediates tumor growth and metastasis in colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(2):218-33.

Heydari K, Saidijam M, Sharifi MR, Dermani FK, Soleimani Asl S, Shabab N, et al. The Effect of miR-200c Inhibition on Chemosensitivity (5- FluoroUracil) in Colorectal Cancer. *Pathology oncology research : POR*. 2018;24(1):145-51.

Gao S, Zhao Z-Y, Wu R, Zhang Y, Zhang Z-Y. Prognostic value of microRNAs in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Manag Res*. 2018;10:907-29.

Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, et al. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*. 2012;31(16):2062-74.

Yi L, Zhong X, Chen Z, Wang Q, Yan Y, Wang J, et al. MicroRNA-147b Promotes Proliferation and Invasion of Human Colorectal Cancer by Targeting RAS Oncogene Family

(RAP2B). *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2019;86(4):173-81.

Cui S, Yang X, Zhang L, Zhao Y, Yan W. LncRNA MAFG-AS1 promotes the progression of colorectal cancer by sponging miR-147b and activation of NDUFA4. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;506(1):251-8.

Peng Y, Zhang P, Huang X, Yan Q, Wu M, Xie R, et al. Direct regulation of FOXK1 by C-jun promotes proliferation, invasion and metastasis in gastric cancer cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(11):e2480.

Wu M, Wang J, Tang W, Zhan X, Li Y, Peng Y, et al. FOXK1 interaction with FHL2 promotes proliferation, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2016;5(11):e271-e.

Buchler T, Pavlik T, Melichar B, Bortlicek Z, Usiakova Z, Dusek L, et al. Bevacizumab with 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin versus bevacizumab with capecitabine and oxaliplatin for metastatic colorectal carcinoma: results of a large registry-based cohort analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:323-.

Jevšinek Skok D, Hauptman N, Boštjančič E, Zidar N. The integrative knowledge base for miRNA-mRNA expression in colorectal cancer. *Scientific reports*. 2019;9(1):18065-.

Takahashi N, Iwasa S, Taniguchi H, Sasaki Y, Shoji H, Honma Y, et al. Prognostic role of ERBB2, MET and VEGFA expression in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR antibodies. *British journal of cancer*. 2016;114(9):1003-11.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DA FMABC

FACULDADE DE MEDICINA DO
ABC/FUNDAÇÃO DO ABC -
FMABC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE MARCADORES METABÓLICOS ENDÓGENOS E EXPRESSÃO DE MIRNAS SOBRE O PROGNÓSTICO, RESPOSTA AO TRATAMENTO E TOXICIDADE EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL

Pesquisador: Fernando Adami

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65923416.8.0000.0082

Instituição Proponente: ONCOLOGICA BRASIL - ENSINO E PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.211.101

Apresentação do Projeto:

Fatores metabólicos e genéticos podem influenciar no risco de desenvolvimento de câncer colorretal (CCR), porém ainda não se sabe de fato os impactos desses fatores metabólicos e genéticos no prognóstico e tratamento dos indivíduos com esta neoplasia. Desta forma, o presente estudo visa a avaliar a relação de marcadores metabólicos endógenos e polimorfismos genéticos (SNPs mRNAs) em mir-196a2 /mir-146a /mir- 149, com o prognóstico, resposta ao tratamento e toxicidade em indivíduos com câncer coloterral estágio III e IV. Será abordado um estudo de coorte prospectivo. Serão recrutados todos os pacientes portadores de câncer colorretal, estádios III e IV, comprovado por exame histopatológico, atendidos em centro de referência em Oncologia no estado do Pará durante seis meses de recrutamento da pesquisa e acompanhados por 2 anos. Como variáveis de exposição serão coletados bimensalmente os seguintes parâmetros laboratoriais: Glicemia em jejum (mg/dl), Insulina, IGF-1, Colesterol Total, HDL, LDL, Triglicerídeos, Hb-Glicada, Homa Índice, lectina, adiponectina e marcador CEA. Serão ainda analisados os seguintes

Endereço: Av. Lauro Gomes, 2.000

Bairro: Vila Sacadura Cabral

CEP: 09.060-870

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br

FACULDADE DE MEDICINA DO
ABC\FUNDAÇÃO DO ABC -
FMABC



Continuação do Parecer: 2.211.101

parâmetros antropométricos: peso, altura e IMC. Além disso, com o mesmo material de diagnóstico da doença, feito por meio de exame anatomopatológico, será realizada a retirada de material genético (RNA/DNA) para procedimentos de análise, por meio de RT-PCR, de polimorfismos genéticos (SNPsmRNAs) em mir-196a2 /mir-146a /mir-149. Como medidas de desfecho serão analisadas sobrevida global e sobrevida livre de doença em 2 anos de acompanhamento dos indivíduos, bem como resposta ao tratamento (respondeu ou não ao tratamento implementado) e toxicidade ao tratamento. A resposta ao tratamento será analisada por meio de Tomografias Computadorizadas (TC) semestrais e exames de PET-CT e colonoscopia anuais. Para classificação de resposta ou não resposta ao tratamento, será utilizado o critério RECIST, por meio de exames de imagem mostrados acima, com profissional radiologista especializado. A toxicidade ao tratamento será avaliada bimensalmente por meio da avaliação médica de retorno conforme quimioterapia implementada e será classificada enquanto: Toxicidade ao tratamento (rash cutâneo, neutropenia, mucosite) e Grau de Toxicidade (I, II, III e IV); Concomitante à coleta das amostras para variáveis de exposição, a cada 6 meses e a cada um ano, no caso das coletas por meio de colonoscopia e avaliação do material genético (RNA/DNA) para procedimentos de análise, por meio de RT PCR, de polimorfismos genéticos -SNPsmRNAs- em mir-196a2 /mir-146a /mir-149) do participantes, o indivíduo passará por reavaliação de dados de tratamento como: mudou o tratamento? (Sim ou não); Se mudou (qual foi o tratamento planejado?); Evolução de estadiamento Clínico? (sim ou não); Estadiamento clínico evoluiu? (sim ou não); Se evoluiu estadiamento clínico qual estava e para qual evoluiu? É esperado que variações da normalidade nos fatores metabólicos endógenos dos indivíduos, influenciem negativamente nos desfechos avaliados (sobrevida global, sobrevida livre de doença e resposta ao tratamento). Além disso, é esperado que fatores metabólicos elevados, como elevação da glicose, possam desencadear polimorfismos genéticos que acarretem diferentes respostas dos indivíduos aos tratamentos implementados, e que polimorfismos de cada indivíduo, ao diagnóstico, contribuam para respostas diferenciadas aos tratamentos

Endereço: Av. Lauro Gomes, 2.000

Bairro: Vila Sacadura Cabral

CEP: 09.060-870

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br

FACULDADE DE MEDICINA DO
ABC\FUNDAÇÃO DO ABC -
FMABC



Continuação do Parecer: 2.211.101

implementados. Com isso, espera-se que tais resultados possam ser aplicados em pacientes com câncer colorretal de maneira efetiva, abrindo o leque dos médicos com possíveis opções terapêuticas e não terapêuticas no acompanhamento desses pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a relação de marcadores metabólicos endógenos e a expressão de miRNA's com o prognóstico, a resposta ao tratamento e a toxicidade em indivíduos com câncer colorretal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esse estudo acarretará o risco de constrangimento dos indivíduos participantes ao responderem os questionamentos da entrevista, além de pequeno desconforto que pode ocorrer durante a coleta de sangue para análises laboratoriais. Outros dados imediatos ou posteriores, seja no plano individual ou coletivo, não são previstos nesta pesquisa. Esses indivíduos terão livre arbítrio de participar ou não do estudo caso seja por eles julgado que sua participação lhes trará infortúnios.

Caberá aos pesquisadores informar aos pacientes participantes e seus responsáveis que os dados coletados por meio de entrevista e prontuário médico terão como finalidade exclusiva a formação de conhecimento científico e que, portanto, é garantida a confidencialidade desses dados, bem como o anonimato dos participantes, que serão caracterizados apenas por suas iniciais. Os responsáveis pelos pacientes também serão informados a respeito do poder que têm de se excluir do estudo a qualquer momento, caso assim julguem conveniente.

Benefícios:

Não serão oferecidos aos indivíduos participantes quaisquer benefícios diretos por meio da participação no estudo em questão. Entretanto, o mesmo possibilitará verificar a influência de marcadores metabólicos endógenos e expressão de miRNA's sobre o prognóstico, resposta ao tratamento e toxicidade em indivíduos com CCR Sendo assim, o estudo gerará conhecimento científico que

Endereço: Av. Lauro Gomes, 2.000

Bairro: Vila Sacadura Cabral

CEP: 09.060-870

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br

FACULDADE DE MEDICINA DO
ABC\FUNDAÇÃO DO ABC -
FMABC



Continuação do Parecer: 2.211.101

poderá ser posteriormente utilizado para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e novos métodos de tratamento para esses pacientes. Além disso, os pacientes terão avaliação contínua durante o estudo e acompanhamento médico contínuo. Aos pesquisadores participantes, o estudo também possibilitará maior envolvimento e experiência no desenvolvimento de trabalhos científicos, além de maior conhecimento acerca do assunto abordado neste estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos de apresentação obrigatória foram submetidos à apreciação por este comitê:

Carta de submissão ao CEP (Apêndice F);

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A);

Protocolos de coleta de dados (Apêndice B);

Autorizações das instituições;

Apêndice C- Clínica Oncológica Brasil;

Apêndice D- Instituto Evandro Chagas;

Apêndice E – Laboratório de Análises Clínicas da FMABC.

Folha de rosto assinado pelo pesquisador principal e responsável institucional;

Declaração de infraestrutura (Apêndice G); Projeto de Pesquisa na íntegra.

Informações Básicas do Projeto

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado.

Endereço: Av. Lauro Gomes, 2.000

Bairro: Vila Sacadura Cabral

CEP: 09.060-870

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br

FACULDADE DE MEDICINA DO
ABC\FUNDAÇÃO DO ABC -
FMABC



Continuação do Parecer: 2.211.101

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_802296.pdf	16/06/2017 12:41:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_completo_1_1.pdf	16/06/2017 12:41:05	Fernando Adami	Aceito
Outros	APENDICE_F_CARTA_DE_SUBMISSAO_AO_CEP.pdf	17/03/2017 17:59:44	Fernando Adami	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	APENDICE_G_DECLARACAO_DE_INFRAESTRUTURA.pdf	17/03/2017 17:59:15	Fernando Adami	Aceito
Folha de Rosto	Folha_De_Rosto_Plataforma_Brasil.pdf	17/03/2017 17:59:00	Fernando Adami	Aceito
Outros	APENDICE_C_AUTORIZACAO_DE_LOCAL_PESQUISA_OBEP.pdf	17/03/2017 17:58:39	Fernando Adami	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_A_TCLE.pdf	13/03/2017 13:46:00	Fernando Adami	Aceito
Outros	APENDICE_F_CARTA_DE_SUBMISSAO_AO_CEP.docx	13/03/2017 13:45:09	Fernando Adami	Aceito
Outros	APENDICE_E_AUTORIZACAO_DE_LOCAL_PESQUISA_FMABC.pdf	13/03/2017 13:44:42	Fernando Adami	Aceito
Outros	APENDICE_D_AUTORIZACAO_DE_LOCAL_PESQUISA_IEC.pdf	12/03/2017 16:37:49	Fernando Adami	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_completo.pdf	12/03/2017 16:35:00	Fernando Adami	Aceito
Outros	APENDICE_B_PROTOCOLOS_DE_COLETA_DE_DADOS.pdf	12/03/2017 16:30:16	Fernando Adami	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTO ANDRE, 10 de Agosto de 2017

Assinado por:
JUVENCIO JOSÉ DUALIBE FURTADO
(Coordenador)

Endereço: Av. Lauro Gomes, 2.000

Bairro: Vila Sacadura Cabral

CEP: 09.060-870

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DA UNAMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIRNAS E IMPACTO NO PROGNÓSTICO EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL NO ESTADO DO PARÁ

Pesquisador: Jonathan Souza Sarraf

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15104519.2.0000.5173

Instituição Proponente: ONCOLOGICA BRASIL - ENSINO E PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.918.029

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas do documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1344337.pdf", datado de 21/02/2020, em que lê-se, no item:

Introdução: Aspectos gerais O câncer é definido como uma patologia multicausal, sendo influenciada por fatores ambientais, étnicos, culturais e genéticos (Oliveira e Fortes, 2013). Apresenta a capacidade de crescer de forma desordenada, invadir tecidos vizinhos e espalhar-se pelo corpo (Inca, 2012; Oliveira e Fortes, 2013). O câncer atinge tanto países desenvolvidos, quanto países em desenvolvimento, sendo assim, considerado um grave problema de saúde pública (Inca, 2012; Rosas et al., 2013). Observa-se uma maior taxa de incidência nos países desenvolvidos. Contudo, mais da metade dos novos casos ocorre em países em desenvolvimento, como o Brasil (Organization, 2002; Rosas et al., 2013). No Brasil, o câncer ocupa o segundo lugar entre as causas de mortes não naturais, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (Inca, 2012). Alguns fatores que influenciaram no aumento dessa doença foram o aumento da expectativa de vida e os maus hábitos, como sedentarismo, tabagismo e consumo excessivo de álcool (Inca, 2012; Rosas et al., 2013).
1.2. Câncer Colorretal (CCR) O câncer colorretal (CCR) é o tipo de neoplasia maligna que se

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

desenvolve no cólon sigmóide, reto e canal anal (Eisenhardt, 2013; Rosas et al., 2013). Seu início ocorre geralmente na forma de um pólipó benigno com potencial cancerígeno, como ospólipos adenomatosos, observados em 96% dos casos(Siegel et al., 2014) (Slattery et al., 2016).Assim como nos outros cânceres, o sedentarismo, tabagismo e consumo excessivode álcool, aumentam a taxa de incidência do CCR (Eisenhardt, 2013). A idade avançadatambém eleva o risco de desenvolvimento desta neoplasia, sendo que 90% dos novoscasos ocorrem em indivíduos maiores que 50 anos (Eisenhardt, 2013). Outros fatoresque também pode influenciar são: sexo, sendo mais prevalente em homens; etnia,obesidade, contato com substâncias cancerígenas e alimentação rica em carnesvermelhas, gorduras, componentes nitrosos, aminas heterocíclicas e pobres em cálcio(Eisenhardt, 2013; Rosas et al., 2013; Siegel et al., 2014).No Brasil, estimam-se para 2016, 16.660 novos casos para homens e 17.620 paramulheres (Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva, 2016).1.3. Câncer Colorretal e fatores de riscoAtualmente, é possível mostrar uma relação direta entre dieta, estilo de vida erisco de desenvolvimento de câncer (Ruiz e Hernández, 2014). Estima-se que cerca de40% dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer estão associados à dieta(Ruiz e Hernández, 2014). A variação da incidência de câncer entre países aparenta teruma larga associação com diferentes hábitos alimentares. É possível sugerir que umadieta ocidental, rica em gorduras e proteínas, aumenta o risco de desenvolvimento decâncer de cólon e reto (Liu et al., 2014). Em contrapartida, é possível verificar os efeitospositivos da ingestão de uma dieta baseada em frutas, vegetais, cereais, legumes e carnebranca, tipicamente mediterrânea, mostrando diminuição da incidência de doençascardiovasculares e certos tipos de câncer (Ruiz e Hernández, 2014).Alguns alimentos estão relacionados diretamente ao desenvolvimento deneoplasia de cólon e reto, dentre eles a carne vermelha e carne processada (Sandhu et al., 2001; Ruiz e Hernández, 2014). O mecanismo provável para esta associação, entre oconsumo de carne e a carcinogênese colorretal, consiste no aumento da quantidade deingesta de gordura contida na carne, causando um aumento da resistência à insulina,bem como na produção de ácidos biliares secundários, o que facilita à carcinogênese.Além disso, metabólitos advindos do consumo da carne como amino-aromáticosheterocíclicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos nitrosos e grupoHeme-Fe são considerados genotóxicas, modificando diretamente o DNA, a partir deseus metabólitos reativos (Sandhu et al., 2001)Assim como a dieta, outros fatores como obesidade, síndrome metabólica eatividade física contribuem como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer decólon e reto (Ruiz e Hernández, 2014). A obesidade está também relacionada com ahiperinsulinemia crônica que leva ao aumento da biodisponibilidade de IGF-1, além de possibilitar variações no microambiente celular pela presença de fatores de inflamação,

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

contribuindo assim, para um mau prognóstico no desenvolvimento do câncer (Ruiz eHernández, 2014).1.4. CCR, estadiamento e classificação A porcentagem de doença localizada ao diagnóstico é de 39% e de doencametastática é de 13.9% segundo Classification of MalignantTumours (TNM) (Brierley,2017). Atualmente, outras classificações começam a ser utilizadas para este tipo de câncer,tendo como base critérios genéticos e moleculares(Cancer Genome Atlas, 2012;Guinney et al., 2015). Essas novas classificações distinguem o CRC em CMS1-hypermutated, microsatellite unstable and strong immune activation; CMS2 - epithelial,marked WNT and MYC signaling activation; CMS3 – epithelial and evident metabolicdysregulation; and CMS4 prominent transforming growth factor activation, stromalinvasion and angiogenesis (Guinney et al.,2015).1.5. CCR e fatores genéticosAlém disso, outras avaliações baseadas principalmente em alterações no DNA,outros fatores moleculares como metilações, expressão de miRNAs e outras alterações epigenéticas e pós transcricionais vêm sendo estudadas, na tentativa de avaliar novos biomarcadores que possam prever prognósticos ou diferentes desfechos nestadoença(Thomas et al., 2015; Lam et al., 2016). Os biomarcadores são utilizados naavaliação de características relacionadas ao tumor e a condição clínica de cada paciente(Erstad et al., 2015; Stintzing et al., 2015). Estas podem prever diferentesprognósticos e determinar diferentes respostas a tratamentos(Qu et al., 2011; Ferlay J,2013; Stintzing et al., 2015). Dentro desta abordagem, podem ser estabelecidos marcadores prognósticos, aqueles que determinam diferentes prognósticos comimpactos na sobrevida global e sobrevida livre de doença como, por exemplo, fatoresligados ao tumor (proliferação celular; invasão tecidual; movimento celular eangiogênese), aos pacientes (reações adversas e toxicidade; resistência e resposta adrogas; estágio TNM e localização do tumor). Além disso, pode apresenta-se comomarcadores preditivos que podem determinar qual a medicação mais indicada para otratamento, a depender de sua avaliação(Ferlay J, 2013; Stintzing et al., 2015). OsmiRNAs podem se comportar tanto como fatores prognósticos, como fatores preditivos.1.6. miRNAsOs miRNAs, são RNAs não codificantes de até 22 nucleotídeos que tem porfinalidade regular a expressão de genes após o processo de transcrição (Hammond,2015). Podem ter grande importância no câncer, quando estão ligados à expressão deoncogenes, genes supressores de tumor e genes ligados à respostas droga-específicas(Hummel et al., 2010; Amirkhah et al., 2015).Todas as famílias de miRNAs passam por uma série de etapas de biogênese queconvertem o transcrito primário de miRNA no ativo, ~ 22 nucleotídeos madurosmiRNA (Figura 1). O miRNA maduro é carregado no RNA induzido complexosilenciador (RISC), onde direciona o complexo para o alvo mRNAs, levando àrepressão translacional e à degradação do mRNA alvo (Hammond, 2015).1.7. miRNAs e CCRNo

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

CRC, esses miRNAs são estudados para o diagnóstico (Corte et al., 2012), determinação de resistência às medicações (Hummel et al., 2010) e até como preditores para tratamentos e biomarcadores para diferentes prognósticos, dependendo de sua expressão nesses pacientes (Corte et al., 2012). A associação da expressão miRNAs com fatores prognósticos tem sido considerada em estudos clínicos sobre o CRC, como por exemplo o hsa-miR-1 e hsa-miR-18a que apresentam impacto no prognóstico de pacientes com CRC quando hipo-expressos e hiper-expressos, respectivamente (Corte et al., 2012). Porém, devido à grande diferença dos desenhos de estudos, diferentes populações e a falta de uma avaliação de qualidade metodológica e do nível de evidência, o processo de translação para a prática clínica ainda é uma grande dificuldade (Tiberio et al., 2015) e esbarra em uma avaliação robusta e adequada do que se pode, de fato, aplicar nos pacientes com câncer de cólon e reto. Para a avaliação da expressão de miRNAs, podem ser utilizadas técnicas como microarray, sequenciamento genético amplo e RT-PCR quantitativo (Hammond, 2015). Em relação ao microarray, esta tecnologia tem trazido muitas informações e tem sido amplamente aplicada para a elucidação de inter-relações

biológicas, efeitos, caminhos e etiologia do câncer (Kundel et al., 2010); (Cheng et al., 2011); (Vierlinger et al., 2011). Além disso, estes ensaios têm contribuído na elucidação de potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de drogas e na identificação de biomarcadores candidatos para melhorar a elucidação do diagnóstico (Pulverer et al., 2012). O termo coletivo microarray descreve uma tecnologia da biologia molecular com alto rendimento que permite uma série de análises em paralelas de até vários milhares de pontos de interesse (por exemplo, genes, mRNA, proteínas) (Sandoval et al., 2011).

Hipótese: Existem miRNA específicos da região estudada que afetam os fatores prognósticos do câncer colorretal.

Metodologia: Este estudo caracteriza-se como observacional-analítico, do tipo coorte. Os sujeitos da pesquisa serão todos os pacientes portadores de câncer colorretal, comprovado por exame histopatológico, atendidos em centro de referência em Oncologia no estado do Pará, cujas informações e amostras biológicas (material parafinado) estejam armazenadas no banco de dados do centro supracitado. Coleta de dados. Os dados sociodemográficos como

idade, sexo, estado civil, cor e renda mensal serão coletados por meio de relatório médico, referente à consulta realizada na admissão no serviço e planejamento do tratamento. Será utilizado, ainda,

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

um Protocolo de Coleta (Apêndice A) para dados clínico-epidemiológico, sendo eles:• Tipo de neoplasia (caracterização histopatológica);• Tamanho do tumor (em cm);• Metástase (sim ou não);• Linfonodos comprometidos (número de linfonodos comprometidos);• Estadiamento patológico (TNM) (T-Tamanho do Tumor, N-linfonodos Comprometidos e M- Metástase à Distância);• Estadiamento clínico (Estádios de III e IV);• Tratamento anterior (Sim ou não, se Sim qual?);• Tratamento Planejado (qual protocolo e medicamentos);• Toxicidade (sim ou não);• Genotipagem K-RAS (selvagem ou mutado);• Tabagismo (Sim ou não);• Alcoolismo (Sim ou não);• Histórico familiar para neoplasia (parentesco direto -1o e 2o grau) (sim ou não);• Peso (kg)• Altura (metros)• IMC (kg/m2);Em primeira fase, serão utilizadas amostras de material tumoral e sadio anteriormente armazenadas na instituição, advinda de pacientes portadores de câncer colorretal, para a extração de RNA total pelo método de trizol. Para estas amostras,serão avaliadas a integridade do RNA extraído por meio do Bioanalyzer, os RNAs seguirão para etapa posterior somente se o RNA integrity Number (RIN) for igual ou maior a 8. Estas seguirão para avaliação do mirnoma na plataforma HiSeq2500Illumina. Após análises dos resultados destas amostras por técnicas de bioinformática,os miRNAs que apresentarem diferenças de expressão (comparação tecido normal e tecido tumoral) seguirão para validação dos dados pela técnica RT-PCR quantitativo.Como medidas de desfecho, serão analisadas sobrevida global e sobrevida livre de doença em 2 anos de acompanhamento dos indivíduos. Além disso,será avaliada resposta ao tratamento (respondeu ou não ao tratamento implementado) e toxicidade ao tratamento. A resposta ao tratamento será analisada por meio de Tomografias Computadorizadas (TC) semestral. Para classificação de resposta ou não resposta ao tratamento, será utilizada o critério RECIST, por meio de exames de imagem mostrados acima, com profissional radiologista especializado. A toxicidade ao tratamento será avaliada bimensalmente, por meio de arquivos médicos, conforme quimioterapia implementada e será classificada enquanto: Toxicidade ao tratamento (rash cutâneo, neutropenia, mucosite) e Grau de Toxicidade (I, II, III e IV);Armazenamento de dados. Os resultados dos exames, protocolos de tratamentos implementados,procedimentos realizados e qualquer outra informação referente ao paciente e às amostras de tecido serão armazenadas no programa Excel e serão obtidos diretamente pela equipe de pesquisadores seguindo ficha própria, por meio do acesso a arquivos médicos.As amostras biológicas tumorais estavam previamente armazenadas pela instituição, sob autorização dos pacientes e serão utilizadas exclusivamente para as análises genéticas deste estudo seguindo as recomendações 466/12 e 510/2016 (ANVISA) para estudos com materiais biológicos.Os dados para análise serão coletados por meio de ficha do pesquisador e,posteriormente, armazenados em banco de dados

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

próprio no programa Excel.

Critérios de inclusão e exclusão:

Critério de Inclusão:

Serão incluídos todos os pacientes portadores de câncer colorretal, comprovado por exame histopatológico, atendidos em centro de referência em Oncologia no estado do Pará, cujas informações e amostras biológicas (material parafinado) estejam armazenadas no banco de dados do centro supracitado.

Critério de Exclusão:

Será excluído da pesquisa todo paciente: i) cujas informações presentes em arquivos médicos não sejam suficientes para o preenchimento do Protocolo de Coleta (apêndice A);

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de miRNA's e impacto no prognóstico em indivíduos com câncer colorretal no estado do Pará.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esse estudo acarretará o risco de exposição de dados clínicos, epidemiológicos ou genéticos dos indivíduos analisados. Porém, para evitar isso, a equipe excluirá do banco de dados os nomes dos pacientes, substituindo-os por números de identificação de acordo com seu registro no sistema da instituição. Ainda, o risco de Descarte inadequado do material.

Benefícios:

Não serão oferecidos aos indivíduos participantes quaisquer benefícios diretos por meio da participação no estudo em questão. Entretanto, este estudo possibilitará verificar a influência de marcadores metabólicos endógenos e expressão de miRNA's sobre o prognóstico, resposta ao tratamento e toxicidade em indivíduos com câncer colorretal. Sendo assim, o estudo gerará conhecimento científico que poderá ser posteriormente utilizado para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e novos métodos de tratamento para esses pacientes. Além disso, os pacientes terão avaliação contínua durante o estudo e acompanhamento médico contínuo. Aos pesquisadores participantes, o estudo também possibilitará maior envolvimento e experiência no desenvolvimento de trabalhos científicos, além de maior conhecimento acerca do assunto abordado neste estudo.

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

projeto aborda tema relevante para a sociedade, em geral, pois possibilitará verificar a influência de marcadores metabólicos endógenos e expressão de miRNA's sobre o prognóstico, resposta ao tratamento e toxicidade em indivíduos com câncer colorretal. Sendo assim, o estudo gerará conhecimento científico que poderá ser posteriormente utilizado para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e novos métodos de tratamento para esses pacientes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos anexados e preenchidos adequadamente:

1. Declaração de aceite do pesquisador responsável, Termo de Compromisso dos Pesquisadores.
2. Projeto no formato Plataforma Brasil.
3. Projeto na versão Original.
4. Carta de dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
5. Carta de Aceite da Instituição Co-participante.
6. Instrumento da Coleta de Dados
7. Orçamento
8. Folha de Rosto
9. Cronograma

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Protocolo submetido em 21/02/2020 atende aos pressupostos das Resoluções CNS 466/2012 e 510/2016, e Norma Operacional 001/2013.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista que foram feitos todos os ajustes recomendados e que o projeto atende a todos os preceitos éticos definidos na Resolução CNS N° 466/2012 e/ou na Resolução CNS N° 510/2016, o colegiado do CEP é favorável à aprovação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br



Continuação do Parecer: 3.918.029

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1344337.pdf	21/02/2020 14:43:24		Aceito
Outros	carta_submissao_pendencias_projeto_UNAMA_CEP.pdf	21/02/2020 14:31:04	Jonathan Souza Sarraf	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo_ajustado_CEP.pdf	21/02/2020 14:29:39	Jonathan Souza Sarraf	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Apendice_C_termo_compromisso_pesquisador_ajustado.pdf	21/02/2020 14:29:05	Jonathan Souza Sarraf	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_nova.pdf	21/02/2020 14:11:38	Jonathan Souza Sarraf	Aceito
Outros	Apendice_B_Carta_de_Dispensa_de_TCLE.pdf	30/04/2019 00:51:02	Jonathan Souza Sarraf	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Apendice_D_Declaracao_de_consentimento_da_Instituicao.pdf	30/04/2019 00:48:55	Jonathan Souza Sarraf	Aceito
Outros	Apendice_A_Protocolo_de_Coleta_de_Dados.pdf	30/04/2019 00:46:15	Jonathan Souza Sarraf	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 16 de Março de 2020

Assinado por:
Rose Martins Tavares
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Alcindo Cacela, N.º 287, Bloco D, 5º andar
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.060-902
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)99177-1348 **Fax:** (91)4009-3005 **E-mail:** cep.unama@unama.br