UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ALINE SIMONETI FONSECA

**Assinatura de mRNA entre adenoma
e adenocarcinoma colorretal**

Ribeirão Preto-SP
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Assinatura de mRNA entre adenoma
e adenocarcinoma colorretal**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Doutora em Ciências Biológicas – Área
de Genética.**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr.

**Ribeirão Preto-SP
2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica

Fonseca, Aline Simoneti

Assinatura de mRNA entre adenoma e adenocarcinoma colorretal. Ribeirão Preto, 2014.

140p.:Il; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Genética

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo

1. expressão diferencial. 2. câncer colorretal. 3. mutação. 4. gene *ETV4*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Simoneti Fonseca

Assinatura de mRNA entre adenoma e adenocarcinoma colorretal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP), vínculo Proc. Núm. 2013/08135-2, CTC/CEPID.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho aos meus pais Frank e Maria Helena e meu irmão Rafael, por todo incentivo, esforço e amor dispensados a mim, para que essa jornada fosse possível.

Agradecimentos

Ao Professor Dr Wilson Araújo da Silva Jr por me preparar técnica e intelectualmente para a vida profissional. Agradeço pelas sugestões e incentivos nos momentos de dificuldades e principalmente por estimular minha curiosidade científica.

Aos amigos do laboratório de bioinformática (BIT), Marcelo, Thais Laureano e Milena por me auxiliarem nas análises dos meus dados. Desejo fazer um agradecimento especial ao Matheus Bürger e ao Jorge Estefano de Souza, que acompanharam cada passo das análises de bioinformática do meu trabalho e tiveram toda paciência do mundo para me explicar quantas vezes fosse necessário o que eu não entendia, e posso garantir, foram muitas coisas!!! Valeu meninos, sem vocês eu estaria perdida!!!

Ao CISBi-NAP/USP (Prof Dr Houtan Noushmehr e Simon Coetzee) por também auxiliarem nas análises de bioinformática.

Aos amigos do LGMB, Adriana, Greice, Cris Aires, Meire, Julio Cesar, Dalila, Ana Júlia, Daniel Vidal, Natália, Karina, Isabela, Kamila, Simone, Raquel, Tais, Carol Arruda, Carol Bessão e em especial Anemari, Cleidson, Luiza, Bruninha e Rafaela. A todos vocês agradeço pela ótima convivência e pelo ambiente de amizade e companherismo que sempre foi a marca do nosso laboratório.

Um agradecimento muito especial a todos os pacientes que generosamente permitiram a realização deste trabalho.

A toda equipe da proctologia do HC-RP. Médicos chefe: Dr Omar Feres, Dr Joaquim Ribeiro, Ana Luiza Normanha, Paulo Henrique Pisi, Rogério Parra e Ricardo Garcia; residentes: Cristiane Jacomini, Ana Elisa Righetti, Leonardo Iezzi, Bruno Medeiros, Marley Feitosa, Vivian Guzela, Raphael Gurgel e Gustavo Urbano; equipe de enfermagem: Jairo Silva, Carlos Ferreira, Fernando Santos, Cely Sampaio, Vanessa Ferro, Roseli Guizelini, Vanessa Zeotti, Micheli Nunes, Vicente Neves Jr, Ângela Rinaldi, Teresinha Ramos e Tatiana Molinari. Todos vocês generosamente, pacientemente e atenciosamente me ensinaram medicina, me ensinaram humanidade e tornaram nossa convivência de um ano e meio um prazer. Meus sinceros agradecimentos por toda ajuda.

A todos os funcionários do Hemocentro e colegas dos Laboratórios de Biologia Celular, Transferência Gênica e Citometria de Fluxo, especialmente a Patrícia, Camila, sempre prontos a nos ajudar.

A todos os amigos não citados nominalmente, que direta ou indiretamente, presentes fisicamente ou não, ajudaram na realização desse trabalho.

A Susie, secretária do Departamento de Genética, pela dedicação, atenção e paciência.

E por último, mas não menos importantes, minhas queridas amigas “*borsas*”, Amanda, Camila, Ana Rita e Sara, pela força que nossa amizade nos deu para enfrentar os desafios da pós-graduação. Obrigada meninas!!!

Lista de Figuras

Figura 1.	Taxa de incidência e mortalidade para o câncer colorretal.....	2
Figura 2.	Representação espacial da incidência do câncer colorretal no Brasil.....	3
Figura 3.	Colonoscopia.....	4
Figura 4.	Representação esquemática dos estágios do tumor colorretal e dos genes mutados ao longo do seu desenvolvimento.....	7
Figura 5.	Grupos moleculares no câncer colorretal.....	14
Figura 6.	Frequência de mutações em câncer colorretal.....	17
Figura 7.	A diversidade e a frequência das alterações gênicas levam a desregulação de vias de sinalização em CCR.....	18
Figura 8.	Esquema para padronização da inibição do gene <i>ETV4</i>	36
Figura 9.	Esquema da diluição utilizada no ensaio clonogênico para obtenção de 100, 300 e 500 células.....	40
Figura 10.	Organograma da análise de expressão gênica.....	43
Figura 11.	<i>Volcano Plot</i>	44
Figura 12.	<i>HeatMap</i>	45
Figura 13.	Validação dos dados de microarranjos.....	50
Figura 14.	Validação dos dados de microarranjos.....	51
Figura 15.	Organograma da análise refinada da assinatura gênica entre adenoma e adenocarcinoma.....	52
Figura 16.	<i>Volcano Plot</i> e <i>HeatMap</i>	52
Figura 17.	Dendograma do agrupamento hierárquico não supervisionado.....	53
Figura 18.	<i>Volcano Plot</i> e <i>HeatMap</i>	54
Figura 19.	Principais vias gênicas relacionadas aos 689 genes diferencialmente expressos entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma.....	56
Figura 20.	Via de adesão celular e remodelamento de matriz extracelular.....	57
Figura 21.	Via de transição epitélio-mesenquimal.....	58
Figura 22.	Via da família IGF associada ao câncer colorretal.....	59
Figura 23.	Principais processos celulares relacionadas aos 689 genes diferencialmente expressos entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma.....	60
Figura 24.	Correlação entre os 689 genes e doenças utilizando a função Biomarcador do MetaCore.....	61
Figura 25.	Expressão relativa do gene <i>ETV4</i> em relação ao tecido normal após silenciamento nas linhagens de câncer colorretal HT29 e HCT15.....	62
Figura 26.	Padronização da concentração do esiRNA <i>ETV4</i> para os estudos funcionais nas linhagens HT29 e HCT15 de câncer colorretal.....	63

Figura 27.	Representação da localização dos sítios de <i>ETV4</i> nos genes <i>CYR61</i> e <i>TNFRSF12A</i>	65
Figura 28.	Silenciamento do gene <i>ETV4</i> e sua consequência na expressão dos genes <i>CYR61</i> , <i>TNFRSF12A</i> e <i>IL8</i> na linhagem HT29.....	66
Figura 29.	Silenciamento do gene <i>ETV4</i> e sua consequência na expressão dos genes <i>CYR61</i> , <i>TNFRSF12A</i> e <i>IL8</i> na linhagem HCT15.....	67
Figura 30.	Ensaio de apoptose.....	68
Figura 31.	Ensaio de proliferação celular.....	69
Figura 32.	Ensaio clonogênico.....	70
Figura 33.	Ensaio de migração.....	71
Figura 34.	Curva Kaplan-Meier para sobrevida e recidiva.....	73

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Biomarcadores moleculares para detecção do câncer colorretal.....	15
Tabela 2.	Lista de 50 genes diferencialmente expressos em adenocarcinomas.....	47
Tabela 3.	Lista dos 50 genes diferencialmente expressos exclusivamente nas 10 amostras de adenocarcinoma.....	48
Tabela 4.	Genes selecionados para validação dos dados de microarranjos por RT-qPCR.....	49
Tabela 5.	Descrição dos sete genes que caracterizam um subgrupo de adenocarcinoma com padrão de expressão semelhante as amostras de adenoma.....	55
Tabela 6.	Genes com sítios de ligação para o fator de transcrição <i>ETV4</i>	65
Tabela 7.	Mutações nos genes <i>APC</i> , <i>TP53</i> e <i>KRAS</i> em dez amostras de sangue, tecido normal, adenoma e adenocarcinoma.....	74
Tabela 8.	Regiões cromossômicas com maior enriquecimento gênico.....	84

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Ad.....	Adenoma
Adc.....	Adenocarcinoma
CCR.....	Câncer colorretal
cDNA.....	DNA complementar
CIMP.....	Fenótipo metilador de ilhas CpG
CIN.....	Instabilidade cromossômica
Ct.....	Ciclo de quantificação
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
dNTP.....	Deoxinucleotídeo
FC.....	<i>Fold-change</i>
FDR.....	Taxa de Falsa Descoberta
FITC.....	Isotiocianato de fluoresceína
GDP.....	Guanosina difosfato
GEO.....	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GSEA.....	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTP.....	Guanosina trifosfato
HC-FMRP.....	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HNPCC.....	Câncer Colorretal Hereditário Não Polipóide
HRM.....	<i>High resolution melting</i>
IARC.....	International Agency for Research on Cancer
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
LOH.....	Perda de heterozigose
mL.....	Mililitro
mM.....	Milimolar
MMR.....	Reparo de mal pareamento
mRNA.....	RNA mensageiro
MSI.....	Instabilidade de microssatélite
Ng.....	Nanograma
Nmols.....	Nanomols
PAF.....	Polipose Adenomatosa Familiar
PBS.....	Tampão salino de fosfato

PCR.....	Reação em cadeia de polimerase
Pmols.....	Picomols
qPCR.....	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RNA.....	Ácido ribonucleico
Rpm.....	Rotação por minuto
RT.....	Transcrição reversa
SFB.....	Soro bovino fetal
T.....	Tecido
TEM.....	Transição epitélio-mesenquimal
USP.....	Universidade de São Paulo
Δ	Delta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
%.....	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
<.....	Menor
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Desenvolvimento do câncer colorretal	2
1.2. A genética no câncer colorretal	5
1.3. Mecanismos genéticos e epigenéticos associados ao câncer colorretal	8
1.3.1. Instabilidade cromossômica.....	8
1.3.1.1. <i>APC</i>	8
1.3.1.2. <i>KRAS</i>	9
1.3.1.3. <i>TP53</i>	10
1.4. Instabilidade de Microsatélite.....	11
1.5. Fenótipo Metilador de Ilhas CpG ou <i>CIMP</i>	12
1.6. Classificação molecular do câncer colorretal.....	13
1.7. Caracterização molecular do câncer colorretal.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Obtenção de material biológico.....	24
4.2. Extração de DNA e RNA.....	25
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
4.4. Triagem de mutações pelo método de <i>High Resolution Melting</i> (HRM).....	27
4.5. Hibridação do microarranjos.....	28
4.6. Análise dos dados de microarranjos.....	29
4.7. Validação da expressão gênica.....	30
4.8. Vias gênicas e posição cromossomal.....	32
4.9. Análise funcional.....	32
4.10. Cultura celular, tripsinização e contagem celular.....	33
4.11. Transfecção e padronização da inibição do gene <i>ETV4</i>	34
4.12. Validação da inibição do gene <i>ETV4</i> e seu efeito sobre os genes <i>CYR61</i> , <i>IL8</i> e <i>TNFRSF12A</i>	36
4.13. Ensaio de apoptose e morte celular.....	37
4.14. Ensaio de proliferação (CFSE).....	38
4.15. Ensaio clonogênico.....	40
4.16. Ensaio de migração.....	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Análise de assinaturas gênicas entre adenoma e adenocarcinoma.....	44
5.2. Validação das análises <i>in silico</i> por RT-qPCR.....	49
5.3. Refinamento da análise de assinaturas gênicas entre adenoma e adenocarcinoma.....	51
5.4. Análise de vias enriquecidas com base na lista de genes diferencialmente	

expressos.....	55
5.4.1. Seleção do gene para validação funcional.....	61
5.4.2. Padronização do ensaio de inibição do gene <i>ETV4</i>	63
5.4.3. Abordagem de bioinformática para identificar alvos do gene <i>ETV4</i> ...	64
5.4.4. Efeito da inibição do gene <i>ETV4</i> na expressão dos genes <i>CYR61</i> , <i>IL8</i> e <i>TNFRSF12</i>	66
5.4.5. Ensaio funcional de apoptose.....	67
5.4.6. Ensaio de proliferação celular (CFSE).....	69
5.4.7. Ensaio clonogênico.....	70
5.4.8. Ensaio de migração.....	71
5.5. Pesquisa de mutações nos genes <i>APC</i> , <i>TP53</i> e <i>KRAS</i>	71
6. DISCUSSÃO.....	77
6.1. Assinatura gênica entre adenoma e adenocarcinoma colorreta.....	77
6.2. Identificação de vias gênicas associadas a tumorigênese colorretal.....	79
6.3. Instabilidade cromossômica no CCR.....	83
6.4. Validação funcional do gene <i>ETV4</i>	86
6.5. Triagem de mutações dos genes <i>APC</i> , <i>TP53</i> e <i>KRAS</i>	89
6.6. Considerações Finais.....	91
7. CONCLUSÃO.....	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9. ANEXOS.....	112

RESUMO

FONSECA, A.S. **Assinatura de mRNA entre adenoma e adenocarcinoma colorretal**. 2013, 140f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O câncer colorretal está entre as principais neoplasias malignas sendo a quarta causa de morte por câncer no mundo e a terceira no Brasil. Mutações nos genes *APC*, *DCC*, *K-RAS* e *TP53* foram originalmente associadas com a progressão do câncer colorretal (CCR) esporádico. Entretanto, estudos de genoma completo e exoma têm revelado outros genes relacionados com o CCR. Como consequência dessas mutações, um conjunto de genes alteram sua expressão modulando vias gênicas em cada estágio da progressão tumoral. Nesse sentido, há um grande esforço para definir assinaturas gênicas que auxiliem na classificação dos tumores quanto ao diagnóstico e prognóstico dos pacientes. Portanto, o objetivo deste projeto foi analisar a expressão gênica em escala genômica de amostras de adenoma e adenocarcinoma colorretal visando identificar novos marcadores genéticos ligados a “transição” adenoma-adenocarcinoma. Para isso, dez amostras pareadas de adenoma e adenocarcinoma do mesmo paciente foram submetidas à análise de expressão gênica pela técnica de microarranjos. Análises de bioinformática, revelaram uma assinatura de 689 genes diferencialmente expressos (*fold-change*>2, *p*<0.05), que permitiram a classificação genética entre o adenoma e o adenocarcinoma. Oitos genes (*IL6*, *IL8*, *OSM*, *SFRP4*, *ETV4*, *ESM1*, *SIM2* e *RETNLB*) foram escolhidos para validação com base na sua função e valor de expressão no tecido tumoral. A análise *in silico* dos genes hiperexpressos realizada no programa MetaCore (análise de dados e vias gênicas) destacou diversas vias gênicas ligadas à tumorigênese, incluindo as de adesão celular e Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM), importantes na fase avançada da progressão tumoral. O gene *ETV4* foi selecionado para realização dos ensaios funcionais em virtude de seus altos níveis de expressão nas dez amostras de adenocarcinoma e participação nos mecanismos de proliferação celular e no TEM. Ensaios *in vitro* de siRNA para o gene *ETV4* resultou na diminuição da proliferação celular e no potencial clonogênico da linhagem HT29. Adicionalmente, foram investigadas mutações nos genes *APC*, *K-RAS* e *TP53*, nas amostras pareadas de adenoma, adenocarcinoma, tecido normal e sangue periférico dos dez pacientes. Todos os pacientes apresentaram mutação germinativas nos três genes. No entanto, apenas os genes *K-RAS* (40%) e *TP53* (30%) apresentaram mutações somáticas e patogênicas, exclusivamente nos adenocarcinomas. Esses resultados demonstraram que, na nossa coorte, mutações nos genes *TP53* e *K-RAS* podem estar contribuindo para a progressão em uma parcela do câncer colorretal do tipo esporádico. Em resumo, o presente estudo aponta que o gene *ETV4* pode contribuir para ativar o mecanismo de proliferação celular em adenocarcinoma colorretal. Além disso, o estudo demonstra a importância da combinação da análise de mutação com o perfil de expressão para melhor compreensão da base molecular do câncer colorretal.

Palavras chave: expressão gênica; adenoma e adenocarcinoma colorretal; mutação; gene *ETV4*

ABSTRACT

FONSECA, A.S. **mRNA Signature between adenoma and adenocarcinoma colorectal**. 2014, 140f. Thesis (PhD). School of Medicine of Ribeirão Preto University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2014.

Colorectal cancer is among the main malignant neoplasia, it is the fourth leading cause of death in the world and the third in Brazil. Mutations in *APC*, *DCC*, *KRAS* and *TP53* genes have been originally associated with the progression of sporadic colorectal cancer (CRC). However genome wide and exome studies have revealed other genes related to CRC. As a consequence of these mutations, a set of genes alters their expression modulating gene pathways in every stage of tumor progression. In this regard, there is great effort to define gene signatures that help to classify tumors in relation to patients' diagnosis and prognosis. Therefore, the objective of this project was to analyze gene expression in genomic scale of colorectal adenoma and adenocarcinoma samples aiming to identify new genetic markers linked to adenoma- adenocarcinoma "transition". For this purpose, ten paired adenoma and adenocarcinoma samples of the same patient were subjected to gene expression analysis by microarrays technique. Bioinformatics analyses revealed a signature of 689 genes differentially expressed (fold-change>2, p<0.05), which allowed the genetic classification between adenoma and adenocarcinoma. Eight genes (*IL6*, *IL8*, *OSM*, *SFRP4*, *ETV4*, *ESM1*, *SIM2* and *RETNLB*) were chosen for validation based on their function and expression value in tumor tissue. *In silico* analysis of hyperexpressed genes, done in the program MetaCore (data analysis and gene pathways), highlighted diverse gene pathways linked to tumorigenesis, including the ones of cell adhesion and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), important in the advanced phase of tumor progression. *ETV4* gene was selected for functional assays due to its high expression levels in the ten samples of adenocarcinoma and due to its participation in cell proliferation mechanisms and in EMT. *In vitro* siRNA assays for *ETV4* gene resulted in the decrease of cell proliferation and in the clonogenic potential of HT29 line. In addition, mutations in *APC*, *KRAS* and *TP53* genes were investigated in paired samples of adenoma, adenocarcinoma, normal tissue, and peripheral blood from ten patients. All patients showed germline mutations in the three genes. However, only *KRAS* (40%) and *TP53* (30%) genes showed somatic and pathogenic mutations, exclusively in adenocarcinomas. These results demonstrated that, in our cohort, mutations in *TP53* and *KRAS* genes might be contributing to progression in a portion of sporadic-type colorectal cancer. In summary, the present study points out that *ETV4* gene might contribute to activate cell proliferation mechanism in colorectal adenocarcinoma. Moreover, the study demonstrates the importance of combining the mutation analysis with expression profile in order to better understanding the molecular basis of colorectal cancer.

Keywords: gene expression; colorectal adenoma and adenocarcinoma; mutation, *ETV4* gene

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento do câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é a terceira forma de câncer mais comum nos homens e a segunda entre as mulheres no mundo. No Brasil, o CCR é o terceiro tipo mais incidente em ambos os sexos (Figura 1) (IARC, 2014).

Figura 1. Taxa de incidência e mortalidade para o câncer colorretal. A: homens no mundo; B: mulheres no mundo; C: homens no Brasil; D: mulheres no Brasil (IARC adaptado, 2014).

Segundo o INCA, a estimativa no Brasil para 2014 é de 15.070 novos casos nos homens e de 17.530 nas mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres (Figura 2).

Figura 2. Representação espacial da incidência do câncer colorretal no Brasil. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres e homens estimada para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação para a neoplasia maligna de cólon e reto (INCA, 2014).

Entre todos os casos de câncer colorretal a maioria (~75%) são esporádicos na origem e o restante é familiar ou relacionado às doenças inflamatórias do intestino (Hisamuddin *et al.*, 2006).

O prognóstico para pacientes com câncer colorretal é altamente dependente do estágio: taxa de sobrevivência de cinco anos em 90% dos casos para Dukes A, mas somente 5% para Dukes D. Infelizmente, somente 10% dos casos de câncer colorretal são diagnosticados precocemente, e a maioria dos pacientes se apresentam em estágio avançado da doença (Li *et al.*, 2009). Portanto, o diagnóstico precoce é importante, e é facilitado por medidas de vigilância tanto invasivas quanto não invasivas. Acredita-se que a dieta, o estilo de vida e outros fatores não genéticos, tenham um forte impacto no risco para o câncer colorretal, entretanto, algumas dessas questões são controversas,

pois as evidências para proteção ou efeito protetor de vários componentes da dieta (por exemplo, vegetais e fibras) têm variado grandemente entre os estudos (de la Chapelle, 2004).

A maioria dos casos de câncer colorretal se desenvolve a partir de uma lesão pré-maligna, o pólipso adenomatoso (Figura 3) (Olschwang *et al.*, 2009).

Figura 3. Colonoscopia mostrando em A um adenoma e em B um adenocarcinoma (www.gastrolab.net/show.htm).

Estudos têm mostrado que adenomas de cólon são muito comuns, ocorrendo em aproximadamente 30% dos indivíduos com mais de 60 anos (Paspatis *et al.*, 2001).

Em termos de padrões de crescimento histológico, a forma mais comum é a tubular. Adenomas tubulares somam mais de 80% dos adenomas. Estes (entre 70%-80% de todos os adenomas e aproximadamente 90% dos adenomas medindo menos de 1 cm) podem ser distinguidos dos vilosos (mais de 80% de estrutura vilosa) e túbulo-vilosos (20%-80% de vilos) (Tannapfel *et al.*, 2010). O tempo necessário para o desenvolvimento de um câncer a partir de um adenoma é longo, com as estimativas indicando um intervalo de 5-10 anos (Davies *et al.*, 2005).

O potencial de evolução maligna está correlacionado ao tamanho, ao padrão de crescimento e ao grau de displasia. O tamanho do adenoma é relevante, considerando que a cancerização ocorre em 1% dos adenomas menores do que 1 cm, em 10% dos adenomas maiores do que 1 cm e menores do que 2 cm e em 50% dos adenomas maiores do que 2 cm. O surgimento de câncer a partir de adenomas menores do que 1 cm na população geral é muito baixa, cerca de 5% (Risio, 2010). Além disso, é estimado que somente 5% de todos os adenomas progridem para malignidade (Shinya & Wolff, 1979).

Somente dados indiretos existem sobre a média e a amplitude da duração da sequência adenoma-adenocarcinoma e sobre o risco da progressão dos diferentes fenótipos de adenomas (tamanho, tipo histológico, aparência polipóide, plana ou serrada) (Muto *et al.*, 1975). Entretanto, pequenos adenomas podem dar origem a cânceres e fortes indicações para a rápida progressão foram documentadas em estudos de populações (Robertson *et al.*, 2005; Vasen *et al.*, 2010). De fato, para a maioria dos novos casos de câncer colorretal que anualmente ocorrem pelo mundo, simplesmente não se sabe se eles progrediram de um adenoma pequeno ou grande, tubular ou viloso, plano ou polipóide (Sillars-Hardebol *et al.*, 2012).

1.2 A genética no câncer colorretal

Em 1990, Fearon e Vogelstein acrescentaram um componente molecular ao princípio da progressão adenoma-adenocarcinoma. Eles propuseram um modelo genético para explicar o desenvolvimento do câncer colorretal. O modelo propunha que: 1) o câncer colorretal surge por mutações em

oncogenes e genes de supressão tumoral; 2) mutações em quatro a cinco genes são necessárias para a formação de um tumor maligno. Menos mutações são características do adenoma; 3) o acúmulo de mutações é mais importante do que a ordem em que elas ocorrem.

Embora a transição de adenoma para adenocarcinoma esteja ainda no campo da hipótese, há evidências indiretas para suportá-la com base em estudos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e genéticos (Clark *et al.*, 1985; Cranley *et al.*, 1986; Winawer *et al.*, 1993; Hoff *et al.*, 1996; Lea *et al.*, 2009). Porém, é amplamente aceito que a ordem sequencial da progressão do carcinoma colorretal seja: “epitélio normal → epitélio displásico → adenocarcinoma → câncer metastático”. Consequentemente, a ordem dos genes mutados correspondente à progressão do carcinoma é a seguinte: *APC* → alterações na metilação/*KRAS* → *MCC/DCC* → *TP53* (Yuan *et al.*, 2001) (Figura 4).

Embora o modelo proposto por Fearon e Vogelstein tenha lançado luz sobre o desenvolvimento do câncer colorretal e a participação de genes como *APC*, *KRAS* e *TP53* sejam importantes em muitos casos da doença, eles não são capazes de explicar todos os casos de câncer colorretal.

Figura 4. Representação esquemática dos estágios do tumor colorretal e dos genes mutados ao longo do seu desenvolvimento.

Muitos estudos têm mostrado a participação de outros mecanismos moleculares no desenvolvimento do câncer colorretal como a instabilidade genética (Hermesen *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 2014; Orsetti *et al.*, 2014), mutações em genes de reparo (Milanizadeh *et al.*, 2013; Vymetalkava *et al.*, 2014) e modificações epigenéticas (Ashktorab *et al.*, 2014; Vedeld *et al.*, 2014).

1.3 Mecanismos genéticos e epigenéticos associados ao câncer colorretal

Três diferentes mecanismos patogênicos têm sido implicados com o desenvolvimento do CCR: **instabilidade cromossômica** (*CIN*-Chromosomal Instability), **instabilidade de microssatélite** (*MSI*-Microsatellite Instability) e **fenótipo metilador de ilhas CpG** (*CIMP* – *CpG Island Methylator Phenotype*).

1.3.1 Instabilidade cromossômica

A instabilidade cromossômica (*CIN*) é caracterizada pela perda de heterozigose (*LOH* – *Loss of Heterozygosity*) ou por amplificações do DNA (Al-Sohaily *et al.*, 2012), e atinge cerca de 65-70% dos CCR esporádicos, levando a deficiência de genes de supressão tumoral e oncogenes tais como, o *APC*, *KRAS*, *DCC/SMAD4* e *TP53* (Pancione *et al.*, 2012).

1.3.1.1 *APC*

O *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) é um gene de supressão tumoral localizado na região 5q22.2 com 15 éxons (<http://AtlasGeneticsOncology.org>). A perda da função normal do *APC* é conhecida por ser um evento precoce tanto nos casos de câncer de cólon familiar quanto esporádico ocorrendo no estágio de pré-adenoma (Half *et al.*, 2009). Mutações do gene *APC* na linhagem germinativa levam ao câncer colorretal familiar e as mutações somáticas são encontradas em 72% dos cânceres esporádicos. Mais de 60%

das mutações esporádicas ocorrem principalmente no éxon 15 entre os códons 1286 e 1513 (Theodoratou *et al.*, 2008).

Geralmente mutações neste gene levam a uma proteína truncada com habilidades alteradas para dirigir a degradação da proteína β -catenina, de tal modo que altos níveis de β -catenina se acumulam no citoplasma e núcleo, levando a desregulação da via de sinalização *APC-Wnt*- β -catenina e mudanças na expressão de uma gama de alvos incluindo Myc (Arends, 2013). Em CCR esporádico, em casos com o *APC* selvagem, a hipermetilação da região promotora ou mutação de ponto na estrutura da β -catenina tem sido descrita para explicar a ativação constitutiva da via Wnt (Armaghany, *et al.* 2012).

1.3.1.2 *KRAS*

O gene *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), está localizado na região 12p12.1 e possui 6 éxons (<http://AtlasGeneticsOncology.org>). O significado da *ras* na regulação da proliferação celular está ilustrado na presença de mutações ativas do *KRAS* em aproximadamente um terço de todos os cânceres humanos, incluindo mais de 50% dos cânceres colorretais (Hisamuddin *et al.*, 2006). Mais de 90% das mutações no *KRAS* são detectadas nos códons 12 e 13 e menos frequentemente nos códons 61 e 63 (Deschoolmeester *et al.*, 2010). A alta frequência de mutações no gene *KRAS* em adenomas, sugere que tais mutações ocorrem no início da mudança de estágio de adenoma para carcinoma (Andreyev *et al.*, 1998) (Figura 4).

A proteína ras é ativada transientemente como resposta a sinais extracelulares como fatores de crescimento, citocinas e hormônios que estimulam receptores de superfície celular. A característica da função Ras é a mudança entre um estado inativo, na qual as proteínas estão ligadas a uma guanosina difosfato (GDP) e um estado ativo na qual a conversão guanosina trifosfato ocorre (GTP) (Brink *et al.*, 2003). Mutações no *KRAS* levam a uma ligação permanente entre *KRAS* e GTP, ativando constitutivamente as vias de sinalização *downstream* (Jönsson *et al.*, 2009). A RAS ativada regula vias de sinalização como a RAS-RAF-MEK-ERK que dirige a proliferação celular, assim como a via PI3K que ativa AKT para suprimir a apoptose (Arends, 2013).

1.3.1.3 *TP53*

O gene *TP53* (*Tumor Protein 53*) está localizado na região 17p13.1 e apresenta 11 éxons sendo o primeiro não codificante (<http://AtlasGeneticsOncology.org>). Mutações neste gene estão presentes em aproximadamente 70% dos carcinomas colorretal, mas tem sido identificado em pouco mais do que 10% dos adenomas menores do que um cm de diâmetro (Losi *et al.*, 1996). A maioria das mutações do *TP53* são substituições missense (75%) dentro dos éxons 5-8 causando perda na função de transativação (Bastien *et al.*, 2008).

Sua função está relacionada com a resposta celular ao estresse, incluindo dano ao DNA, sinal proliferativo aberrante e estresse oxidativo (Vogelstein *et al.*, 2000). Sob condições normais a p53 é negativamente regulada por MDM2, E3 ubiquitina ligase e uma proteína relacionada MDM4,

que se liga ao domínio de transativação da p53 para degradação por ubiquitinação. Em células com um alto nível de estresse, as interações entre MDM2, MDM4 e p53 são desfeitas, permitindo a p53 exercer sua função na atividade transcricional. Definido como o “guardião do genoma”, *TP53* é o mestre regulador que controla a transcrição de centenas de genes envolvidos no metabolismo do DNA, apoptose, regulação do ciclo celular, senescência, angiogênese, resposta imune, diferenciação celular, motilidade e migração (Pino e Chung, 2010).

1.4 Instabilidade de Microsatélite

Microsatélites são sequências repetitivas de DNA de 1-4 nucleotídeos que são particularmente suscetíveis a erros de replicação quando o sistema de reparo do DNA (MMR) está ineficiente. Este sistema tem como função a manutenção da fidelidade da replicação do DNA (Hsieh *et al.*, 2008). A perda de atividade do sistema MMR é rotineiramente avaliada pela medida do grau de instabilidade de microsatélites ligados aos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, que são genes envolvidos no reparo de DNA (Jung *et al.*, 2004). Um tumor é classificado como MSI-alto se dois ou mais dos marcadores utilizados para caracterizar MSI mostram diferenças no número de repetições. No caso de MSI-baixo, se apenas um dos marcadores é instável. Quando não há diferença no número de repetições em nenhum marcador, classificamos como MS-estável (Boland *et al.*, 1998).

A deficiência do sistema MMR pode também ocorrer pela hipermetilação do promotor do gene *MLH1* ou por mutação de ponto em um dos demais genes de reparo (*MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6*) (Armaghany *et al.*, 2012).

Aproximadamente 15% dos CCR esporádicos e mais de 95% dos casos de Câncer Colorretal Hereditário Não Polipóide ou do inglês HNPCC (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*), também conhecido como Síndrome de Lynch, é devido a instabilidade de microssatélites (Thomas *et al.*, 1996). Nos casos de CCR esporádicos, a base molecular dos pacientes classificados com grau de MSI-alto é principalmente devido ao silenciamento epigenético do promotor do gene *MLH1* (Herman *et al.*, 1998). Uma fração menor dos casos de MSI-alto é devido a mutação V600E no oncogene *BRAF*, um membro da família RAF envolvido na via gênica RAS-RAF-MAP quinase de crescimento celular (Parsons *et al.*, 2012), e por mutações no gene *TGFBR2*, também associado com a perda de controle do crescimento celular (Grady *et al.*, 2008).

1.5 Fenótipo Metilador de Ilhas CpG ou CIMP

A metilação do DNA consiste na adição de uma radical metil (-CH₃) na citosina dos dinucleotídeos CpG de ilhas CpG, localizadas na região promotora de um conjunto de genes. Este mecanismo está associado com a progressão do tumor devido a metilação de genes relacionados com a regulação do ciclo celular, apoptose, angiogênese, reparo de DNA, invasão e adesão (Colussi *et al.*, 2013; Mojarad *et al.*, 2013).

Os fenótipos CIMP são caracterizados quanto ao número dos seguintes genes metilados: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *CDKN2A* (*p16*), *CRABP1* e *MLH1*. Quando os oito genes estão metilados, os CCR são caracterizados como CIMP-alto, enquanto que abaixo de oito, são sempre classificados como CIMP-baixo. Os CCRs do tipo CIMP-alto têm sido associados com as seguintes características: idade avançada, sexo feminino, de localização proximal (cólon direito), mucinoso e de pobre diferenciação, com instabilidade de microssatélite, mutação no *BRAF*, *TP53* selvagem, estabilidade cromossômica e Wnt/ β -catenina inativa (Nosho *et al.*, 2008).

1.6 Classificação molecular do câncer colorretal

O propósito da classificação molecular dos tumores tem como objetivo encontrar características moleculares entre grupos de tumores para ajudar na predição da patogênese de um caso em particular.

Baseado no tipo de instabilidade e na metilação do DNA, Jass (2007) classificou os CCRs em cinco subtipos moleculares (Figura 5):

- 1- CIMP-alto, metilação de *MLH1*, mutação no *BRAF*, estabilidade cromossômica, MSI-alto, origem nos pólipos serrados, conhecido geralmente como esporádico MSI-alto (12%).
- 2- CIMP-alto, metilação parcial do *MLH1*, mutação no *BRAF*, estabilidade cromossômica, MS-estável ou MSI-baixa, origem em pólipos serrados (8%).
- 3- CIMP-baixo, mutação no *KRAS*, metilação do *MGMT*, instabilidade cromossômica, MS-estável ou MSI-baixa, origem em adenomas ou pólipos serrados (20%).
- 4- CIMP-negativo, instabilidade cromossômica, principalmente MS-estável, origem em adenomas (pode ser esporádico, *FAP* ou *MUTYH* polipose associado) (57%).

- 5- Síndrome de Lynch, CIMP-negativo, sem mutação no *BRAF*, estabilidade cromossômica, MSI-alto, origem em adenomas (3%).

A sobreposição entre os subtipos não é excludente. Por exemplo, mutação no *KRAS* e não no *BRAF* pode eventualmente ocorrer em associação com CIMP-alto.

Posteriormente, Ogino *et al.* (2008), incorporando novos dados às análises, dividiram os subtipos em seis, com algumas pequenas diferenças nos subtipos 2 e 4. Hinoue *et al.* (2011) por meio do perfil de metilação em larga escala, classificaram quatro distintos subtipos de câncer colorretal. A classificação dos tumores também foi realizada através de expressão gênica, reclassificando os tumores pelo acréscimo de novas informações (Budinska, *et al.*, 2013. Marisa *et al.*, 2013).

Figura 5. Derivação dos grupos moleculares 1-5 no câncer colorretal baseado no fenótipo metilador de ilha CpG (CIMP – H-alto; L-baixo; Neg-negativo) e instabilidade de microssatélite (MSI – H-alto; L-baixo; S-estável) (Retirado de Jass, 2007).

Uma vez que a maioria dos grupos de pesquisa utilizam diferentes plataformas e métodos estatísticos para classificar subtipos moleculares no CCR, é imprescindível chegar a um consenso para que essas informações possam ser utilizadas na prática clínica.

1.7 Caracterização molecular do câncer colorretal

Estudos de expressão gênica em tecido normal, adenoma e adenocarcinoma, têm sido muito utilizados para revelar biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do câncer colorretal (Carvalho *et al.*, 2012; de Wit *et al.*, 2012; Christodoulou *et al.* 2014; Gao *et al.*, 2014; Polistena *et al.*, 2014). Neste contexto, técnicas genômicas, tais como análises de microarranjos, permitem investigar o perfil de expressão gênica em larga-escala possibilitando a análise de vias gênicas atuantes na tumorigênese (García-Bilbao *et al.*, 2012). Através dessa técnica vários potenciais biomarcadores foram descobertos (Tabela 1) (Tanaka *et al.*, 2010).

Tabela 1. Biomarcadores moleculares para detecção do câncer colorretal

Uso clínico	Material	Tipo	Potencial marcador
Em uso	Fezes	Proteína	Hemoglobina fecal
	Soro	Proteína Carboidrato	CEA CA19.9
Validação clínica	Fezes	DNA	<i>KRAS</i>
		DNA	<i>APC</i>
		DNA	<i>L-DNA</i>
		DNA	<i>p53</i>
Desenvolvimento pré-clínico	Soro	Proteína	TIMP-1
	Soro	Proteína	Spondin-2, <i>DcR3</i> , <i>Trail-R2</i> , <i>Reg4</i> , <i>MIC1</i>
		Proteína	<i>PSME3</i>
		Proteína	<i>NNMT</i>
		Proteína	<i>CRMP-2</i>
		Proteína	SELDI (apolipoprotein C1, C3a-desArg, α 1-antitrypsin, transferrin)
		Proteína	<i>HNP 1-3</i>
		Proteína	<i>MIF</i>
		Proteína	<i>M-CSF</i>
		Proteína	<i>M2-PK</i>
		Proteína	Prolactin
		Proteína	CCSA-2, -3, -4
		Proteína	<i>MMP-9</i> , -7
		Proteína	Laminin
	Plasma	DNA	Septin 9
	WBC	DNA	5-gene panel (<i>CDA</i> , <i>BANK1</i> , <i>BCNP1</i> , <i>MS4A1</i> , <i>MGC20553</i>)

Adaptado de Tanaka *et al* (2010).

Entretanto, alguns deles têm sido questionados quanto a falta de sensibilidade e especificidade (*CEA*, *CA19-9*), outros devido a uma pobre performance de classificar os estágios iniciais de CCR (*TIMP1*) e alguns outros permanecem como uma promessa devido a falta de evidências experimentais para implementação na rotina (*CCSA3*, *CCSA4*, *MIF*, *DcR3*, *Spondin-2*) (Jain *et al.*, 2007; De Roock *et al.*, 2009).

Em 2012, um consórcio de pesquisadores denominado *The Cancer Genome Atlas Network (TCGA)*, publicou um amplo espectro de alterações somáticas no carcinoma colorretal após análise de exoma, número de cópias do DNA, metilação do DNA, expressão de mRNA e microRNA em 276 pacientes (Bogaert *et al.*, 2014). O estudo revelou que 16% das amostras eram hipermutadas, sendo que três quartos destas apresentaram alta instabilidade de microssatélites e silenciamento do *MLH1*, e um quarto apresentou mutações em genes de reparo do DNA e na polimerase ϵ (*POLE*). O restante dos casos era geneticamente homogêneo quanto as alterações genômicas. Vinte e quatro genes estavam significativamente mutados, e em adição aos genes mutados nos CCRs (*APC*, *TP53*, *SMAD4*, *PIK3CA* e *KRAS*), foram também encontradas mutações nos genes *ARID1A*, *SOX9* e *FAM123B* (Figura 6).

Figura 6. Frequência de mutações em câncer colorretal. a, frequência de mutações em cada uma das amostras de tumores de 224 pacientes. Há uma clara separação entre as amostras hipermutadas e não-hipermutadas. Vermelho, MSI alto, CIMP alto ou *MLH1* silenciado; azul claro, MSI baixo ou CIMP baixo; preto, reto; branco, colon; cinza, sem dados. Na caixa, mutações em genes de reparo e *POLE* entre as amostras hipermutadas. A ordem das amostras é a mesma do gráfico principal. b, Genes significativamente mutados em hipermutados e não-hipermutados nos tumores. A barra azul representa gene identificados pelo algoritmo MutSig e as barras pretas representam genes identificados pela análise manual dos dados sequenciados (Retirado de TCGA, 2012).

Análises integradas de mutações, número de cópias e alterações de expressão em mRNA em 195 tumores definiram muito bem as vias que estavam afetadas nos CCRs. No grupo dos tumores hipermutados foram identificadas alterações recorrentes nas vias WNT, MAPK, PI3K, TGFB e p53 (Figura 7) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Figura 7. A diversidade e a frequência das alterações gênicas levam a desregulação de vias de sinalização em CCR. Amostras não-hipermutadas (nHM; n5165) e hipermutadas (HM; n530) com dados completo foram analisadas separadamente. As alterações foram definidas por mutações somáticas, deleções homozigóticas, altos níveis de amplificações focais e em alguns casos, por significativa aumento ou redução na regulação da expressão gênica (*IGF2*, *FZD10*, *SMAD4*). Alterações frequentes são expressas como uma porcentagem de todos os casos. Vermelho representa genes ativados e azul genes inativados. Painel inferior aparece para cada amostra se, ao menos, um gene, em cada uma das cinco vias descritas nesta figura é alterada (Retirado do TCGA, 2012).

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Poucos estudos têm focado na análise molecular da progressão adenoma-adenocarcinoma colorretal. Estima-se que somente 5% dos adenomas possam evoluir para um câncer. Entretanto, frequentemente, as amostras de biópsias retiradas durante as intervenções endoscópicas não podem ser avaliadas corretamente por histologia convencional e também não há um critério molecular que possa indicar o potencial maligno de um adenoma (Tang *et al.*, 2010). Traçar o perfil molecular para os adenomas e adenocarcinomas poderia auxiliar nessas deficiências além de aumentar o conhecimento a respeito de vias atuantes nesta transição e gerar novas formas de diagnóstico, prognóstico e tratamento para esta doença.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificação de genes e/ou vias gênicas associados com o desenvolvimento do câncer colorretal.

Objetivos específicos

1. Estabeecer uma assinatura gênica que possa diferenciar o adenoma do adenocarcinoma;
2. Identificação de vias gênicas mais enriquecidas com genes diferencialmente expressos em adenoma e adenocarcinoma;
3. Selecionar genes dentro das vias mais enriquecidas para validação funcional;
4. Adicionalmente, investigar mutações nos genes *APC*, *K-RAS* e *TP53*, e associar com a evolução clínica dos pacientes.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de material biológico

Dez amostras de adenoma, adenocarcinoma, sangue (5 ml de sangue periférico coletado por punção venosa em *vacutainer* com EDTA) e tecido normal próximo ao tumor colorretal foram coletadas de dez pacientes. Exceto os adenomas que foram em sua maioria coletados ainda no exame colonoscópico (permite a visualização da mucosa do intestino grosso por meio da inserção de um tubo flexível com iluminação central via anal para a detecção e retirada de lesões pré-malignas e/ou malignas iniciais) os demais tecidos foram coletados durante procedimento cirúrgico no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP) sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas FMRP/USP (Anexo 1) entre novembro de 2010 e maio de 2012. Os quatro tecidos foram coletados do mesmo paciente com espaço de tempo de poucos dias entre a coleta do adenoma e dos outros tecidos. Exceto o sangue, os demais tecidos foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e mantidos dessa forma até o momento da extração de RNA e DNA. Outras 17 amostras de adenoma e seis de adenocarcinoma foram coletadas para validação. Todas as amostras foram colhidas após concordância do paciente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2 e 3).

O exame anátomo-patológico das amostras foi realizado por médicos patologistas do HC- FMRP. Nenhum dos pacientes recebeu tratamento químico

ou radioterápico antes da coleta dos tecidos. Pacientes com Síndrome de Lynch, doença inflamatória do intestino ou PAF (Polipose Adenomatosa Familiar) foram excluídos das análises. Na tabela 1 dos anexos, estão apresentados os dados clínicos dos pacientes.

4.2 Extração de DNA e RNA

Devido ao tamanho reduzido da maioria das amostras, o tecido congelado foi macerado com o auxílio de um pistilo confeccionado para tubo criogênico. O tubo criogênico com a amostra de tecido foi acondicionado no gelo seco e em seguida, o nitrogênio líquido foi colocado sobre a amostra para a manutenção do congelamento. O RNA e o DNA total foram isolados dos tecidos macerados e congelados utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de sangue foram processadas no dia da coleta. O material foi centrifugado à 2500 rpm por 8 minutos à temperatura ambiente. O *buffy coat* foi retirado e colocado em um tubo de centrífuga de 15 ml. Foram adicionados 7 ml de ACK 1x (solução para lise de eritrócitos), homogeneizado e deixado no gelo por 10 min. Em seguida o tubo foi completado para 15 ml com PBS 1x (solução fosfato salina) e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 10 ml de PBS 1x. O material foi novamente centrifugado à 1500 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” foi adicionado 250 µl de PBS 1x. O conteúdo foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml com 750 µl

de Trizol LS Reagent (Invitrogen). O material foi congelado a -80°C até a extração.

A concentração do RNA e do DNA foram avaliados com o espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Life Sciences). A qualidade dos RNAs utilizados nos microarranjos foi avaliada no aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Todas as amostras apresentaram um RIN (*RNA Integrity Number*) igual ou superior a sete. As demais 22 amostras tiveram a integridade do RNA avaliada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi utilizada para estabelecer as condições ideais requeridas para a técnica de HRM. Nesse caso, a temperatura de anelamento é o parâmetro mais importante na análise. Para o gene *APC* foram utilizados 31 pares de *primers* (Miyoshi *et al.*, 1992, com modificações) capazes de amplificar os 15 éxons codificantes do gene (o éxon 15 foi dividido em 17 *amplicons* devido ao tamanho) (Anexos - Tabela 2). Para o gene *TP53* foram utilizados 12 *primers* que amplificaram 10 éxons (os éxons 4 e 5 também foram divididos para reduzir o tamanho do fragmento). Os *primers* utilizados foram os descritos por Bastien *et al.* (2008) com modificações (Anexos – Tabela 3). Já para o gene *KRAS* foi utilizado um *primer* para o éxon 2 que abrangesse os códon 12 e 13 como descrito por Fassina *et al.* (2010) (Anexos –Tabela 4).

As amplificações foram realizadas com um volume total de 25 µl contendo 15 µl de água miliQ, 2,5 µl de tampão 10X BV pH 8,8 (Invitrogen), 2 µl de dNTP a 1,25 mM, 1,5 µl para cada *primer* a 2,5 nmols/µl, 0,5 µl de Taq DNA Polimerase a 5U (Invitrogen) e 2 µl de DNA (100ng/µl). Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4 Triagem de mutações pelo método de *High Resolution Melting* (HRM)

Após a definição das temperaturas de anelamento dos *primers*, foram iniciadas as análises de pesquisa de mutação nas amostras de adenoma e adenocarcinoma pelo método de *High Resolution Melting* (HRM) nos genes *APC* e *TP53* (Anexos – Figura 1). A triagem de mutações no gene *K-RAS* foi realizada por sequenciamento direto (método Sanger).

As reações foram realizadas com um volume total de 20 µl contendo: 1,2 µl de água miliQ, 2,4 µl de cada *primer* a 2,5 µM, 10 µl de MeltDoctor HRM™ Master Mix (Applied Biosystems) e 4 µl de DNA a 5ng/µl. Para a reação da curva de dissociação os parâmetros foram: 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

O perfil das amostras foi analisado através do software *High Resolution Melt* v2.0 (Applied Biosystems). Uma amostra de cada variante foi então sequenciada pelo método Sanger para identificação da mutação.

As amostras com perfil diferenciado foram submetidas a uma PCR e o seu produto foi utilizado em uma nova PCR com o *kit* de sequenciamento Big

Dye Terminator v3.1 no qual foram utilizados 2 µl de tampão, 2 µl de H₂O, 4 µl de primer (forward ou reverse – 2,5 µM), 1 µl de produto de PCR (100 a 200 ng/µl) em um volume final de 10 µl.

No termociclador o ciclo teve as seguintes etapas: 95°C por 1 min, 25 ciclos de - 95°C por 10 segundos, 51°C por 5 segundos e 60°C por 4 min. O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI 3500xL Genetic Analyzer. Os cromatogramas gerados no sequenciamento foram analisados no software Chromas Lite v2.1.

Após o sequenciamento e validação das mutações nas amostras de adenoma e adenocarcinoma, as amostras de sangue e margem também foram sequenciadas, entretanto, especificamente para as mutações identificadas nos seus pares de adenoma e/ou adenocarcinoma.

Para a elaboração das curvas de sobrevivência e recidiva Kaplan-Meier foi utilizado o teste *log rank* entre os pacientes com e sem mutações no gene K-RAS e na associação K-RAS+TP53. A sobrevivência foi estimada a partir da data da cirurgia até a morte do paciente. As análises foram desenvolvidas utilizando o programa SPSS versão 20 (SPSS IBM, New York, USA).

4.5 Hibridação do microarranjos

Para avaliar o nível de expressão gênica entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma colorretal, foi utilizada a plataforma *Whole Human Genome Microarray Kit 4x44K v2* (G4112F, Agilent Technologies). Para as hibridações, 200 ng de RNA total de cada amostra foram submetidos à síntese de cDNA e foram transcritos em cRNA-Cy3, através do *Low Input Quick Amp Gene*

Expression Labeling Kit (Agilent Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, o cRNA-Cy3 de cada amostra foi purificado utilizando o *RNeasy kit* (Qiagen) e então preparado para a hibridação através do *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies). As amostras foram hibridadas por 17 horas a 65°C em forno rotativo. As lâminas dos arranjos foram lavadas, seguindo as orientações do fabricante, e em seguida scaneadas utilizando-se o *scanner* GenePix 4000B (Axon Instruments) junto com o GenePix Pro 6.0 software. O sinal de intensidade de hibridação de cada array foi extraído por meio do software *Agilent Feature Extraction* 9.5.3.1.

4.6 Análise dos dados de microarranjos

Para a análise dos dados dos microarranjos foi utilizado o software estatístico R (R Core Team, 2013) e pacotes do projeto Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). Na avaliação da qualidade dos dados foi utilizado o pacote *arrayQualityMetrics* (Kauffmann *et al.*, 2009). Para a normalização foi realizada uma abordagem de três etapas aplicando os métodos presentes no pacote *Limma* (Smyth, 2005). Inicialmente foi aplicado o método *Cyclic Loess* entre as réplicas técnicas, quantile entre as amostras do grupo adenoma e adenocarcinoma e quantile entre os arrays (Bolstad *et al.*, 2003). Para a detecção de genes diferencialmente expresso, o teste oferecido pelo pacote *Limma* foi o escolhido (Smyth, 2005). O método de Benjamini-Hochberg foi aplicado para a correção para múltiplos testes (Benjamini *et al.*, 1995). O *heatmap* foi construído para avaliar o padrão de expressão dos genes

diferencialmente expressos. A distância euclidiana e o método *complete linkage* foi utilizado para a clusterização das amostras e genes.

4.7 Validação da expressão gênica

A validação dos resultados de microarranjos foi realizada nos dez pares de amostras e em outras 15 amostras de adenoma e seis de adenocarcinoma. Para a síntese de cDNA foi utilizado o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 2,5 ul de tampão 10X, 1,0 ul de dNTP, 2,5 ul de *random primer*, 1,5 ul de enzima, 2 ul de RNA (500 ng/ ul) e 15,5 ul de água. O volume final da reação foi de 25 ul. Após a reação, o cDNA foi diluído 5x.

A seleção dos genes para o teste de confiança dos dados de microarranjos foi baseado seguindo o critério de $FDR \leq 0,001$, $FC \geq 4$ e uma relação direta com a tumorigênese.

A validação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando-se a metodologia *Taqman* (Applied Biosystems). O controle endógeno utilizado foi o gene *HPRT1* (4326321E, Applied Biosystems) e as sondas de expressão gênica foram: *IL6* (Hs00174131, Applied Biosystems), *IL8* (Hs 00174103, Applied Biosystems), *OSM* (Hs00968300_g1, Applied Biosystems), *SFRP4* (Hs.PT.51.1726538.g, IDT), *ETV4* (Hs.PT.56a.23047301.g, IDT) *SIM2* (Hs.PT.51.20479148.g, IDT), *ESM1* (Hs.PT.51.19279572.g, IDT) e *RETNLB* (Hs. PT.51.1296566, IDT), nas seguintes condições: 5,0 ul de Master-Mix (Applied Biosystems), 0,5 ul de sonda, 2,0 ul de cDNA e 2,5 ul de água, com volume final de 10 ul. Para a

escolha do controle endógeno foram avaliados três genes: *GAPDH*, *HPRT1* e *TBP*. O gene *HPRT1* foi o que apresentou menor oscilação de expressão entre as amostras testadas e por isso ele foi selecionado para as análises.

Todas as reações foram realizadas em termociclador *ABI prism® 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

A expressão relativa para cada gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde o $\Delta\Delta CT$ corresponde a diferença entre o ΔCT do adenocarcinoma e o ΔCT do transcrito normalizador (adenoma) (Livak e Schmittgen, 2001) para as dez amostras pareadas.

$$\Delta Ct \text{ do Normalizador} = Ct \text{ normalizador} - Ct \text{ endógeno}$$

$$\Delta Ct \text{ do Adenocarcinoma} = Ct \text{ adenocarcinoma} - Ct \text{ endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Normalizador} - \Delta Ct \text{ Adenocarcinoma}$$

Já para as amostras extras de validação, foi calculada a média do ΔCT dos adenomas e dos carcinomas, e então, o ΔCT de cada adenoma foi dividido pela média dos carcinomas e vice-versa. Os resultados foram colocados em $\log_2$ para diminuir a discrepância dos valores e então foram avaliados graficamente.

Os gráficos bloxpot foram desenhados no programa *GraphPad Prism* 5.01 para Windows, (*GraphPad Software*, San Diego California USA). O teste estatístico utilizado na validação das amostras pareadas foi o Mann-Whitney com $p \leq 0,05$, uma cauda.

4.8 Vias gênicas e posição cromossomal

A associação da expressão diferencial com vias gênicas, processos celulares, doenças e posição cromossomal, foi realizada nos 689 genes diferencialmente expressos através de dois programas: o MetaCore (Thomson Reuters) (análise de dados e vias gênicas) e o Molecular Signatures Database (MSigDB) que é uma coleção de conjuntos gênicos utilizados dentro do programa *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (Subramaniana *et al.*, 2005). Para a análise no MetaCore foi criado um arquivo txt. com uma coluna contendo os símbolos dos 689 genes e outra coluna com o respectivo valor de *fold change*. Este arquivo foi inserido no programa e os genes analisados. Já para o programa GSEA, no qual foi avaliada somente a posição cromossômica dos genes, os símbolos dos genes foram copiados e colados dentro do programa. Os valores estatísticos foram gerados pelo próprio GSEA e como critério de corte foram escolhidas as posições cromossômicas com $p < 0,005$.

4.9 Análise funcional

A seleção do gene para os estudos de análise funcional foi baseada em sua expressão. Dentre os 689 genes, foram verificados aqueles que apresentavam hiperexpressão nas dez amostras de adenocarcinoma. Após esta primeira triagem, restaram 30 genes. Os 30 genes foram avaliados individualmente quanto a sua importância no câncer e o gene *ETV4* foi o escolhido.

Para os ensaios de análise funcional, as linhagens de carcinoma colorretal HT29 e HCT15 foram escolhidas e avaliadas quanto ao nível de expressão do gene *ETV4* por meio de RT-qPCR. O controle endógeno utilizado foi o gene *HPRT1* e a sonda de expressão gênica foi a *ETV4* (Hs.PT.56a.23047301.g, IDT). Para o cálculo de expressão, foi utilizado os valores de $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no qual para o segundo caso o calibrador foi a média dos $2^{-\Delta Ct}$ das amostras de tecido normal.

Três experimentos independentes e em triplicata foram realizados em todos os ensaios funcionais, exceto para o de proliferação, no qual foram realizados dois ensaios independentes, em triplicata. Os resultados foram analisados no software *GraphPad Prism* 5.01 para Windows, (*GraphPad Software*, San Diego California USA) utilizando o teste t pareado com $p < 0,05$, uma cauda.

4.10 Cultura celular, tripsinização e contagem celular

O protocolo de cultura celular foi utilizado para todos os ensaios funcionais. Qualquer modificação realizada foi descrita no procedimento específico.

As linhagens HT29 e HCT15 foram selecionadas para os ensaios. A cultura celular ocorreu em meio RPMI suplementado (10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,5% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), em garrafas de cultura de 75 cm², com condições de temperatura e umidade controladas (37°C, 5% de CO₂, 95% de umidade) na estufa. Ao atingir cerca de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas. Na tripsinização, o meio foi retirado,

descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X estéril. Em seguida 3 ml de Tryple (degrada as proteínas e descola as células da garrafa) foi adicionado e as garrafas foram deixadas na estufa por três minutos para facilitar a ação da Tryple (as células não devem permanecer por muito tempo em contato com a Tryple que pode causar lise celular). Após os três minutos na estufa, as garrafas foram retiradas e foram dadas algumas batidas manuais em sua lateral para que as células terminassem de se soltar. Para interromper a ação da Tryple, 10 ml de meio RPMI suplementado foram adicionados. As células foram então passadas para um tubo cônico graduado de 50 ml e centrifugadas à 1200 rpm por 10 minutos. O meio foi descartado e as células foram ressuspensas em 3 ml de meio RPMI suplementado. Em um tubo de microcentrifuga foram colocados 90ul de PBS 1X e 10 ul de células. A mistura foi homogeneizada e 10 ul dessa mistura foi colocada em outro tubo de microcentrifuga com 10 ul de Azul de Tripán. As células foram em seguida contadas na Câmara de Neubauer. A contagem foi feita da seguinte forma: a soma das células dos quatro quadrantes foi dividida por quatro e multiplicado por 6×10^5 (10000 da área da Câmara x 20 da diluição x 3 do volume que as células foram ressuspensas).

4.11 Transfecção e padronização da inibição do gene *ETV4*

A reação de transfecção foi padronizada para um total de 10^5 células. Dessa forma, em um tubo de microcentrifuga foram colocados 50 ul de meio Opti-Mem (Life Technologies) + 1 ul de lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) e em outro tubo, 50 ul de meio Opti-Mem (Life Technologies) + o volume

referente a concentração desejada do esiRNA *ETV4* ou esiRNA *EGFP* (controle negativo). A inibição do gene *ETV4* foi realizada utilizando o inibidor de mRNA MISSION esiRNA *ETV4*. Os inibidores MISSION são uma forma alternativa de silenciamento gênico por RNAi em células de mamíferos. Os siRNA endoribonuclease (esiRNA) são sintetizados pela transcrição in vitro de um dsRNA gene-específico de 300-600 pb, seguido por uma digestão enzimática utilizando RNases. Esta digestão produz “pools” de moléculas tipo siRNA. Devido aos esiRNAs serem *pools* de siRNAs que alvejam a mesma sequência de mRNA, eles são altamente específicos. Esta estratégia elimina a abordagem de tentativa e erro de identificação de um siRNA sintético útil e assegura um risco mínimo de efeitos fora do alvo (Sigma-Aldrich, *Technical Bulletin*).

É importante ressaltar que os esses valores utilizados nos experimentos, são equivalentes a uma reação, portanto, os valores foram multiplicados de acordo com o número de reações efetuadas.

Para a padronização da concentração foram testadas as concentrações de 10 pmol, 15 pmol e 25 pmol correspondentes aos volumes de 0,5 ul, 0,75 ul e 1,25 ul respectivamente. A mesma reação foi realizada com o esiRNA *EGFP*. Os tubos contendo Opti-Mem+lipofectamina foram misturados com os tubos contendo Opti-Mem+esiRNA e ficaram à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, 10^5 células foram colocadas nos tubos, misturadas e aplicadas em placa de 24 poços com 400 ul de meio RPMI suplementado somente com SBF 10% para que o antibiótico não interferisse na transfecção (Figura 8). Após 24h, o meio foi completamente substituído por RPMI suplementado com SBF 10% e antibiótico. Após 48h da transfecção, as células

foram tripsinizadas e ao *pellet* celular foi acrescentado 200 μ l de PBS 1x e 800 μ l de Trizol Reagent (Invitrogen) para extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação da expressão por RT-qPCR.

Figura 8. Esquema para padronização da inibição do gene *ETV4*. 1- células tratadas com esiRNA *ETV4* – 10 pmol; 2- células tratadas com esiRNA *ETV4* - 15 pmol; 3- células tratadas com esiRNA *ETV4*- 25 pmol; 4- células tratadas com esiRNA *EGFP* – 10 pmol; 5- células tratadas com esiRNA *EGFP*- 15 pmol; 6- células tratadas com esiRNA *EGFP*- 25 pmol. Este experimento foi realizado em duplicata.

4.12 Validação da inibição do gene *ETV4* e seu efeito sobre os genes *CYR61*, *IL8* e *TNFRSF12A*

Através de uma análise *in silico* realizada pelo laboratório de bioinformática (BIT) utilizando os dados brutos publicados no artigo de Hollenhorst *et al.* (2011), os genes *CYR61* e *TNFRSF12* foram selecionados como possíveis alvos do gene *ETV4*. Basicamente foram baixados da internet os dados do GEO (*Gene Expression Omnibus*) de Chip-Seq contendo as regiões de pico (regiões de grande confiabilidade na ligação da proteína ao gene). Em seguida as coordenadas genômicas da referência hg18 foram convertidas para hg19 através da ferramenta liftOver. Com a ferramenta bedtools as regiões de pico do ChIP-Seq foram cruzadas com os 689 genes diferencialmente expressos identificando os genes com os sítios de ligação para o fator de transcrição *ETV4*. As buscas por regiões de pico foram restritas a 1000 pares de base em relação à região 5' e 3' UTR do gene mais próximo.

O gene *IL8* foi escolhido por já ter sido descrito como alvo do gene *ETV4* (Chen *et al.*, 2011).

Para testar essa hipótese, uma placa completa de seis poços foi plaqueada com 10^5 células por poço. Três poços foram transfectados com controle negativo e os outros três com o esiRNA *ETV4* (concentração de 10 pmol). Após 48h de transfecção, as células foram tripsinizadas e o RNA foi extraído. Em seguida foi realizado um RT-qPCR com as sondas Taqman para os genes *CYR61* (Hs00155479_m1 – Applied Biosystems), *IL8*, *TNFRSF12* (HsPT56a20097054.g - IDT), *ETV4* e *HPRT1* como controle endógeno. Por fim, foi calculado o valor da expressão relativa com o controle negativo (esiRNA *EGFP*) sendo utilizado como normalizador.

4.13 Ensaio de apoptose e morte celular

O ensaio de apoptose é baseado na exposição da fosfatidilserina (PS) no exterior da membrana plasmática durante a morte celular. A anexina V preferencialmente liga-se a fosfolipídios negativamente carregados com a fosfatidilserina. A marcação de anexina V com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) forma a base para o ensaio da anexina V para detectar a morte celular por apoptose através de citometria de fluxo (Hoornaert *et al.*, 1997).

A apoptose celular foi analisada na linhagem HT29 e HCT15. A cultura das células foi realizado em garrafa de 75 cm² até atingir a confluência de aproximadamente 80%. As células foram então tripsinizadas e transfectadas com esiRNA na concentração de 10 pmol. Após 48h de transfecção as células foram novamente tripsinizadas e colocadas em tubo para citometria com 300 μ l

de tampão de ligação e 5 ul de anexina (FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I - BD Biosciences). Os tubos foram protegidos da luz por 10 minutos e então foram adicionado 50 ul de iodeto de propídio (PI) (1mg/ml), para distinguir as células com perda da integridade da membrana (morte celular).

O material foi analisado em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Laboratório de Citometria de Fluxo – Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto) com comprimento de onda de excitação de 488 nm (para o PI) e 530 nm (para FITC). Os dados foram obtidos utilizando o programa CellQuest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra.

4.14 Ensaio de proliferação celular (CFSE)

Células das linhagens HT29 e HCT15 foram cultivadas e tripsinizadas. Após a primeira centrifugação foi adicionado ao *pellet* 2 ml de PBS 1X com 5% de SBF. As células foram contadas e duas alíquotas de $1,5 \times 10^6$ células e uma terceira 5×10^5 foram separadas. As alíquotas de $1,5 \times 10^6$ células foram colocadas em um tubo de centrífuga de 15 ml com 1ml de PBS 1X com 5% de SBF. Na parede de cada um dos dois tubos com $1,5 \times 10^6$ células, foi acrescentado 110 ul de PBS 1X, com 5% de SBF e 1,1 ul de CFSE (5, 6-carboxifluoresceína diacetato succimidil éster) na concentração de 5 uM/ul e então misturados com as células. Os tubos ficaram dentro da estufa a 37°C por 5 minutos. Após esse período foi colocado mais 1 ml de PBS 1X acrescido de 5% de SBF e o conteúdo centrifugado a 1200 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI

completo e novamente as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 15 ml de meio RPMI com SBF 10% sem antibiótico. A alíquota menor não sofreu nenhum tratamento e foi acrescentado somente 5 ml de meio RPMI com SBF 10% sem antibiótico.

Paralelamente ao tratamento com CFSE, foram preparadas as reações de transfecção para as duas alíquotas de $1,5 \times 10^6$ células (uma para o esiETV4 e outra para o controle negativo). As reações de transfecção foram misturadas às células e cada tratamento foi distribuído (1 ml por poço) em 15 poços de placa de 24 poços. Como o experimento foi realizado por cinco dias e em triplicata, foram necessários 15 poços de cada tratamento. Além disso, foram plaqueados cinco poços (alíquota de 5×10^5 células sem tratamento) como calibradores na citometria.

Após 24h, três poços transfectados com controle negativo, três poços transfectados com o inibidor e um poço sem marcação foram tripsinizados. As células foram colocadas em tubos de citometria, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e o pellet foi ressuspensado em 100 μ l de PBS 1x. Em seguida, as células foram levadas para a citometria. Esse último procedimento se repetiu por mais quatro dias, perfazendo cinco leituras com diferença de 24h entre cada uma.

O comprimento de onda utilizado foi 530nm e um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra.

4.15 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado com as linhagens HT29 e HCT15. Após tripsinização das garrafas em cultura, 10^5 células de cada linhagem foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI completo. Foram testadas três quantidades de células em placa de 6 poços: 100, 300 e 500 células. Para obtenção do número de células necessário foi feita uma diluição seriada da seguinte forma (Figura 9):

Figura 9. Esquema da diluição utilizada no ensaio clonogênico para obtenção de 100, 300 e 500 células.

Para 100 células, foi colocado no poço todo o conteúdo da diluição 10^2 . Para 500 células, 500 µl da diluição 10^3 foi colocada em cada poço e completado com 500 µl de meio RPMI completo. Para 300 células, 300 µl da diluição 10^3 foi rediluída em 700 µl de meio RPMI completo e então plaqueada. Cada número de células foi avaliado em triplicata. As células foram cultivadas por 12 dias e o número escolhido foi de 100 células.

Em seguida novas células das duas linhagens foram tripsinizadas e transfectadas com esiRNA *ETV4* e o controle negativo. As células foram diluídas como no esquema acima e plaqueadas em placa de 6 poços.

Após 12 dias de cultura, o meio foi retirado de todos os poços e estes foram lavados duas vezes com PBS 1x. Foi acrescentado 1ml de paraformaldeído 4%, por 20 minutos, em cada poço para a fixação das células. O paraformaldeído foi retirado e então colocado 1 ml de cristal violeta 0,5% por 20 minutos para coloração. Depois de 20 minutos, o cristal violeta foi retirado e os poços foram lavados com água e deixados para secar. Após a secagem as placas foram fotografadas no ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e contadas.

4.16 Ensaio de migração

As linhagens HT29 e HCT15 foram cultivadas e tripsinizadas e alguns números de células foram testados para a padronização. Os ensaios foram realizados em insertos com poros de 8 μ m (Greiner Bio One) em placas de 24 poços. A técnica consistiu em acondicionar os insertos nos poços de uma placa de 24 poços e adicionar dentro do inserto 200 μ l de meio RPMI não suplementado com a quantidade de células desejadas e 600 μ l de meio RPMI com SBF 10% no poços (em contato com a parte inferior do inserto). Para a HCT15 foram testadas 20000, 30000, 40000 e 50000 células por inserto e para HT29 foram testadas 20000 e 40000. Ficou definido o número de 20000 células para as duas linhagens.

Após a padronização, as células em cultura foram novamente tripsinizadas e transfectadas com o inibidor do gene *ETV4* e seu controle negativo e colocadas em cultura mais uma vez por 24h. Então, foram tripsinizadas, contadas e em seguidas colocadas nos insertos por mais 24h. O ensaio foi realizado em duas etapas para diminuir a proliferação celular dentro dos insertos. Depois desse período, as células foram fixadas, coradas e a membrana interna foi limpa com hastes flexíveis de algodão. Esse procedimento teve como objetivo retirar as células que não migraram. Depois de secos, os insertos foram fotografados em oito quadrantes e as células de cada quadrante contadas com auxílio do programa ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004). As células dos oitos quadrantes foram somadas, divididas pelo total aplicado e multiplicadas por 100.

Resultados

5. Resultados

5.1 Análise de assinaturas gênicas entre adenoma e adenocarcinoma

A definição da expressão de genes que pudessem diferenciar o adenoma do adenocarcinoma, foi realizada com base nos resultados de expressão gênica global em 10 pares de adenoma e adenocarcinoma provenientes do mesmo paciente. A figura 10 representa o processo para análise dos genes diferencialmente expressos.

Figura 10. Organograma da análise de expressão gênica

Inicialmente os dados foram analisados comparando os valores de *fold-change* ($FC \geq 2$) com os valores de p ajustado ($FDR \leq 0,05$) de adenomas contra adenocarcinomas, visualizados em um gráfico do tipo *Volcano Plot* (Figura 10). Resumidamente, usando tais parâmetros, 689 genes estavam diferencialmente expressos entre os dois tipos tumorais, sendo 329 hiperexpressos em adenocarcinomas (pontos em cor rosa) e 360 hiperexpressos nos adenomas (pontos em cor verde) (Figura 11).

Figura 11. *Volcano Plot*. O *Volcano Plot* representa o conjunto de genes analisados a partir dos dados de microarranjos de dez amostras pareadas de adenoma e adenocarcinoma colorretal. As análises estatísticas mostraram 689 genes diferencialmente expressos. Pontos em rosa representam genes hiperexpressos no adenocarcinoma e hipoexpressos no adenoma; Pontos em verde representam genes hiperexpressos no adenoma e hipoexpressos no adenocarcinoma. $FDR \leq 0,05$ e $FC \geq 2$.

Em seguida, uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, com base nos 689 genes obtidos pela análise de *Volcano Plot*, foi capaz de separar os adenomas dos adenocarcinomas em dois principais

grupos de genes diferencialmente expressos em relação ao adenocarcinoma:

1) grupo A (cor laranja), definidos por genes hiperexpressos em amostras de adenocarcinoma (Figura 11). Os subgrupos A1, A2 e A3, são caracterizados por grandezas diferente de expressão; 2) grupo B (em tom de azul), definidos por genes hipoexpressos em adenocarcinoma. Similarmento com no grupo A, os subgrupos B1, B2 e B3, são caracterizados por grandezas diferentes de expressão (Figura 12).

Figura 12. *HeatMap* do agrupamento hierárquico supervisionado em amostras de adenoma e adenocarcinoma com base nos 689 genes diferencialmente expressos ($FC \geq 2$ e $FDR \leq 0,05$).

Com base nas análises de *Volcano Plot* e do agrupamento hierárquico não supervisionado, um conjunto dos 50 genes mais expressos e menos expressos em adenocarcinoma foram listados na tabela 2. Estes genes podem ser usados como candidatos para a definição da assinatura do número mínimo de genes para diferenciar o adenoma do adenocarcinoma. Para auxiliar na escolha dos genes candidatos para a definição da assinatura gênica de adenocarcinoma, foi realizada uma nova lista com 29 genes hiperexpressos e 21 genes hipoexpressos nas 10 amostras de adenocarcinoma (Tabela 3).

Tabela 2. Lista de 50 genes diferencialmente expressos em adenocarcinomas

Gene	RefSeq	Descrição	FC*	FDR**
Hiperexpressos				
SFRP4	NM_003014.3	secreted frizzled-related protein 4	4,51	0,00072
SIM2	NM_005069.3	single-minded family bHLH transcription factor 2	4,26	7,63E-07
EREG	NM_001432.2	epiregulin	3,54	0,01111
FAP	NM_001291807.1	fibroblast activation protein, alpha	3,34	0,00112
COL11A1	NM_001190709.1	collagen, type XI, alpha 1	3,09	0,00228
FUT1	NM_000148.3	fucosyltransferase 1	3,04	0,00017
ESM1	NM_001135604.1	endothelial cell-specific molecule 1	2,98	0,00060
FABP6	NM_001040442.1	fatty acid binding protein 6, ileal	2,95	0,00420
IL8	NM_000584.3	interleukin 8	2,94	0,02829
OSM	NM_020530.4	oncostatin	2,87	0,00913
IL6	NM_000600.3	interleukin 6	2,76	0,03991
COL1A1	NM_000088.3	collagen, type I, alpha 1	2,75	0,00181
STC2	NM_003714.2	stanniocalcin 2	2,74	0,00060
TDO2	NM_005651.3	tryptophan 2,3-dioxygenase	2,69	0,00264
OTX1	NM_001199770.1	orthodenticle homeobox 1	2,68	0,01271
WNT2	NM_003391.2	wingless-type MMTV integration site family member 2	2,65	0,00601
CTHRC1	NM_001256099.1	collagen triple helix repeat containing 1	2,51	0,00401
COL8A1	NM_001850.4	collagen, type VIII, alpha 1	2,50	0,00706
NOX4	NM_001143836.2	NADPH oxidase 4	2,49	0,00154
TNFAIP6	NM_007115.3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	2,48	0,00776
INHBA	NM_002192.2	inhibin, beta A	2,47	0,00594
CYR61	NM_001554.4	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2,41	0,01300
GREM1	NM_001191322.1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist	2,40	0,03523
CXCL10	NM_001565.3	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2,40	0,01026
ETV4	NM_001079675.2	ets variant 4	2,19	0,00060
Hipoexpressos				
CLCA1	NM_001285.3	chloride channel accessory 1	-7,97	0,00155
DEFA5	NM_021010.1	defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	-6,31	0,00844
ITLN1	NM_017625.2	intelectin 1	-6,29	0,00668
ZG16	NM_152338.3	zymogen granule protein 16	-5,90	0,01116
DEFA6	NM_001926.3	defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	-5,89	0,01083
FCGBP	NM_003890.2	Fc fragment of IgG binding protein	-4,68	0,00706
RETNLB	NM_032579.2	resistin like beta	-4,33	0,00060
ITLN2	NM_080878.2	intelectin 2	-4,26	0,00391
FAM55D	NM_001077639.1	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 4	-4,12	0,00392
HEPACAM2	NM_001039372.2	HEPACAM family member 2	-4,05	0,00131
B3GNT6	NM_138706.4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6	-4,03	0,00177
BEST2	NM_017682.2	bestrophin 2	-3,86	0,00099
REG4	NM_001159352.1	regenerating islet-derived family member 4	-3,81	0,04009
UGT2B17	NM_001077.3	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	-3,71	0,00601
SPINK4	NM_014471.1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	-3,68	0,03954
LOC389023	NR_036580.1	DPP10 antisense RNA 1	-3,67	0,01926
SLC4A4	NM_001098484.2	solute carrier family 4	-3,63	0,01004
UGT2B15	NM_001076.3	UDP glucuronosyltransferase 2 family polypeptide B15	-3,56	0,00500
KLK12	NM_019598.2	kallikrein-related peptidase 12	-3,56	0,00633
L1TD1	NM_001164835.1	LINE-1 type transposase domain containing 1	-3,52	0,02738
ADH1A	NM_000667.3	alcohol dehydrogenase 1A (class I) alpha polypeptide	-3,48	0,00852
PLA2G2A	NM_000300.3	phospholipase A2, group IIA (platelets synovial fluid)	-3,43	0,01981
VSIG2	NM_014312.3	V-set and immunoglobulin domain containing 2	-3,43	0,00681
ADH1C	NM_000669.4	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	-3,39	0,00776
MB	NM_005368.2	myoglobin	-3,25	0,00144

*FC (Fold Change log2); **FDR (Taxa de falsa descoberta). Os genes destacados em negrito foram selecionados para validação por RT-qPCR.

Tabela 3. Lista dos 50 genes diferencialmente expressos exclusivamente nas 10 amostras de adenocarcinoma.

Gene	RefSeq	Descrição	FC*	FDR**
Hiperexpressos				
SIM2	NM_005069.3	single-minded family bHLH transcription factor 2	4,26	7,63E-07
FAP	NM_001291807.1	fibroblast activation protein, alpha	3,34	0,00112
FUT1	NM_000148.3	fucosyltransferase 1	3,04	0,00017
ESM1	NM_001135604.1	endothelial cell-specific molecule 1	2,98	0,00060
FABP6	NM_001040442.1	fatty acid binding protein 6, ileal	2,95	0,00420
COL1A1	NM_000088.3	collagen, type I, alpha 1	2,75	0,00181
WNT2	NM_003391.2	wingless-type MMTV integration site family member 2	2,65	0,00601
ELN	NM_000501.3	elastin	2,22	0,00072
ETV4	NM_001079675.2	ets variant 4	2,18	0,00060
ACAN	NM_001135.3	aggrecan	2,12	0,00107
LARP6	NM_001286679.1	La ribonucleoprotein domain family, member 6	2,00	0,00111
FADS1	NM_013402.4	fatty acid desaturase	2,00	0,00099
SCRN1	NM_001145513.1	secernin 1	1,97	0,00188
LY6E	NM_001127213.1	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	1,95	0,00691
TCFL5	NM_006602.2	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	1,91	0,00426
PROCR	NM_006404.4	protein C receptor, endothelial	1,90	0,00745
FAM150A	NM_001195732.1	family with sequence similarity 150 member A	1,87	0,00283
COL5A2	NM_000393.3	collagen, type V, alpha 2	1,73	0,00601
FAM72D	NM_207418.2	family with sequence similarity 72 member D	1,62	0,00262
SPARC	NM_003118.3	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	1,62	0,00420
PARVB	NM_001003828.2	parvin, beta	1,56	0,01610
VEGFA	NM_001025366.2	vascular endothelial growth factor A	1,46	0,00123
UBE2C	NM_001281741.1	ubiquitin-conjugating enzyme	1,45	0,00060
C1orf135	NM_001287490.1	aurora kinase A and ninein interacting protein	1,35	0,00177
GK	NM_000167.5	glycerol kinase	1,26	0,00437
LRP8	NM_001018054.2	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	1,15	0,01137
DIAPH3	NM_001042517.1	diaphanous-related formin 3	1,11	0,00178
FAM162B	NM_001085480.2	family with sequence similarity 162 member B	1,05	0,04851
CENPJ	NM_018451.4	centromere protein J	1,04	0,00243
Hipoexpressos				
CLCA1	NM_001285.3	chloride channel accessory 1	-7,97	0,00155
HEPACAM2	NM_001039372.2	HEPACAM family member 2	-4,05	0,00131
B3GNT6	NM_138706.4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6	-4,03	0,00177
BEST2	NM_017682.2	bestrophin 2	-3,86	0,00099
L1TD1	NM_001164835.1	LINE-1 type transposase domain containing 1	-3,52	0,02738
ADH1A	NM_000667.3	alcohol dehydrogenase 1A (class I) alpha polypeptide	-3,48	0,00852
ADH1C	NM_000669.4	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	-3,39	0,00776
GALNT8	NM_017417.1	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 8	-3,24	0,00084
SPTLC3	NM_018327.2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3	-2,99	0,00244
SPINK2	NM_001271718.1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin inhibitor)	-2,49	0,01166
ATOH8	NM_153778.3	atonal homolog 8	-2,32	0,00643
KCNMA1	NM_001014797.2	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	-2,27	0,00060
NEURL	NM_004210.4	neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1	-2,19	0,00109
PIGR	NM_002644.3	polymeric immunoglobulin receptor	-2,14	0,01272
MFSD4	NM_181644.4	major facilitator superfamily domain containing 4	-2,11	0,00201
ARHGAP44	NM_014859.4	Rho GTPase activating protein 44	-2,06	0,00060
SERTAD4	NM_019605.3	SERTA domain containing 4	-1,82	0,00072
PLA2G10	NM_003561.1	phospholipase A2, group X	-1,73	0,04438
NEDD4L	NM_001144964.1	neuronal precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase	-1,61	0,00123
ACADVL	NM_000018.3	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	-1,20	0,00099
PID1	NM_001100818.1	phosphotyrosine interaction domain containing 1	-1,19	0,01212

*FC (Fold Change log2); **FDR (Taxa de falsa descoberta). Os genes destacados em negrito são os mesmos selecionados na tabela 2 para validação por RT-qPCR.

5.2 Validação das análises *in silico* por RT-qPCR

Os genes *SIM2* (*Single-minded family bHLH transcription factor*), *ESM1* (*Endothelial cell-specific molecule 1*), *SFRP4* (*Secreted Frizzled-Related Protein 4*), *IL8* (*Interleukin 8*), *IL6* (*Interleukin 6*), *OSM* (*Oncostatin M*), *ETV4* (*ETS variant 4*) e *RETNLB* (*Resistin like beta*) foram selecionados para validação com base nos valores de $FC \geq 4$, $FDR \leq 0,05$ e por terem alguma relação com câncer já descrito na literatura (Lu *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2011; Ford *et al.*, 2013; Waugh *et al.*, 2008; Waldner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Aytes *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2008) (Tabela 4). Todos os oito genes estão listados na tabela 2, sendo que três deles (*SIM2*, *ESM1* e o *ETV4*) também estão presentes na lista dos genes da tabela 3, que selecionou apenas genes hiperexpressos nas 10 amostras de adenocarcinoma. A validação por RT-qPCR foi realizada nos dez pares de amostras analisadas por microarranjos e em outras 15 amostras de adenomas e seis de adenocarcinomas.

Tabela 4. Genes selecionados para validação dos dados de microarranjos por RT-qPCR. Entre os seis genes, cinco foram hiperexpressos no adenocarcinoma e um foi hipoexpresso.

Genes	FC*	Valor de <i>p</i>	FDR**
<i>SFRP4</i> (<i>Secreted Frizzled-Related Protein 4</i>)	4,51	4,18E-07	0,0007
<i>SIM2</i> (<i>Single-minded family bHLH transcription factor</i>)	4,26	2,80E-11	7,63E-07
<i>ESM1</i> (<i>Endothelial cell-specific molecule 1</i>)	2,98	1,94E-07	0,0006
<i>IL-8</i> (<i>Interleukin 8</i>)	2,94	0,001552	0,0283
<i>OSM</i> (<i>Oncostatin M</i>)	2,87	0,000179	0,0091
<i>IL-6</i> (<i>Interleukin 6</i>)	2,76	0,003003	0,0399
<i>ETV4</i> (<i>ETS variant 4</i>)	2,19	8,58E-08	0,0006
<i>RETNLB</i> (<i>Resistin like beta</i>)	-4,33	2,94E-07	0,0006

*FC (*Fold Change log2*); **FDR (Taxa de falsa descoberta).

Os resultados da validação por RT-qPCR foram similares aos dados de microarranjos, como pode ser observado nas figuras 13 e 14. A figura 13A demonstra a razão da expressão em adenoma e adenocarcinoma dos sete genes obtidos com dados dos microarranjos, e a figura 13B demonstra a razão de expressão por RT-qPCR. A mesma análise foi realizada com o gene *RETNLB*, hipoexpresso nos adenocarcinomas (Figura 14 A e B). Os valores de p foram significativos para os oito genes avaliados, mostrando dessa forma a legitimidade dos resultados dos microarranjos; IL6 $p=0,003003$; IL8 $p=0,001552$; SFRP4 $p=4,18E-07$; OSM $p=0,000179$; SIM2 $p<0,0002$; ESM1 $p<0,0002$; *ETV4* $p=8,58E-08$ (Figura 13A); IL-6 $p<0,0001$, IL8 $p=0,0093$; SFRP4 $p=0,0002$; OSM $p<0,0001$; SIM2 $p<0,0001$; ESM1 $p<0,0001$; *ETV4* $p<0,0001$ (Figura 13B); *RETNLB* $p<0,0001$ (Figura 14A); *RETNLB* $p<0,0001$ (Figura 14B).

Figura 13. Validação dos dados de microarranjos. A) Expressão relativa, pela técnica dos microarranjos de sete genes selecionados para validação. B) Validação dos sete genes por RT-qPCR. As linhas pontilhadas (azul e vermelha) representam a média das médias dos níveis de expressão entre os genes. O *fold change* (FC log2) entre as médias no adenomas e adenocarcinomas foram de 6,75 e 4,93, respectivamente.

Figura 14. Validação dos dados de microarranjos. A) Expressão relativa do gene RETNLB pela técnica dos microarranjos selecionado para validação. B) Validação do gene por RT-qPCR. O *fold change* (FC log2) entre a média dos gene nos adenomas e adenocarcinomas foi de 8,50 e 11,12, respectivamente.

5.3. Refinamento da análise de assinaturas gênicas entre adenoma e adenocarcinoma

Um segunda análise foi realizada com parâmetros mais rigorosos de $FC > 4$ e $FDR < 0,05$, na tentativa de identificar assinaturas gênicas com poder de diferenciar os adenomas de adenocarcinomas com um número menor de genes. Uma representação da análise etapa por etapa, está descrita na Figura 15. Usando os parâmetros citados acima, realizamos a análise de *Volcano Plot*, que identificou 111 genes diferencialmente expressos, sendo 29 genes hiperexpressos em adenocarcinomas e 82 hiperexpressos em adenomas (Figura 16A). Interessantemente, a análise de agrupamento hierárquico supervisionado com os 111 genes revelou um grupo composto por quatro amostras (adc-3, adc-7, adc-8 e adc-9) de adenocarcinoma, que apresentaram sete genes com padrão de expressão similar as amostras de adenoma (Figura 16B).

Figura 15. Organograma da análise refinada da assinatura gênica entre adenoma e adenocarcinoma

Figura 16. *Volcano Plot*. A) As análises estatísticas mostraram 111 genes diferencialmente expressos entre adenoma e adenocarcinoma colorretal. Foram identificados 29 genes hiperexpressos (vermelho) e 82 hipoexpressos (verdes) no adenocarcinoma. $FC \geq 4$ e $FDR \leq 0,05$; B) *HeatMap* do agrupamento hierárquico supervisionado nas dez amostras de adenoma e adenocarcinoma através dos 111 genes diferencialmente expressos. A linha cheia (vermelha) representa as quatro amostras de adenocarcinoma com perfil de expressão semelhante ao dos adenomas e a linha pontilhada (laranja) representa os sete genes que caracterizam essas quatro amostras ($FC \geq 4$ e $FDR \leq 0,05$).

Quando as mesmas amostras foram agrupadas na forma de dendograma não-supervisionado, as quatro amostras agruparam juntas com os adenomas, seguramente mediadas pela expressão similar dos sete genes entre os dois grupos (Figura 17). Esse resultado sugere que as quatro amostras possam representar um estado pré-adenocarcinoma.

Figura 17. Dendograma do agrupamento hierárquico não supervisionado. A linha pontilhada representa as amostras adc-3, adc-7, adc-8 e adc-9 de adenocarcinoma como um subgrupo das amostras de adenoma.

Para definir melhor o padrão de expressão gênica das quatro amostras, foi realizada uma análise de *Volcano Plot*, seguida da análise de agrupamento hierárquico não supervisionado apenas com nove amostras de adenocarcinoma. A amostra adc-7 foi excluída da análise pela sua instabilidade com relação ao grupo de origem. O resultado da análise de *Volcano Plot* ($FC \geq 4$ e $FDR \leq 0,05$) apontou 21 genes diferencialmente expressos (Figura 18A), que foram, em seguida, submetidos à análise de agrupamento hierárquico não-

supervisionado (Figura 18B), ratificando o subgrupo formado pelas amostras adc-3, adc-8 e adc-9 com base na expressão de sete genes (*REG4*, *NXPE4*, *LYPD8*, *ZG16*, *ITLN1*, *MUC2* e *FCGBP*) (Tabela 5).

Figura 18. A) *Volcano Plot* dos 21 genes diferencialmente expressos entre adenoma e adenocarcinoma colorretal. B) *HeatMap* do agrupamento hierárquico não-supervisionado em nove amostras adenocarcinoma. As três amostras em vermelho (Adc-3, Adc-8 e Adc-9) indicam o subgrupo de adenocarcinomas. Os quatro genes representados pela linha pontilhada (vermelho) foram os maiores responsáveis pela formação do subgrupo de adenocarcinomas ($FC \geq 4$ e $FDR \leq 0,05$).

Tabela 5. Descrição dos sete genes que caracterizam um subgrupo de adenocarcinoma com padrão de expressão semelhante as amostras de adenoma.

Gene	RefSeq	Descrição	FC*	FDR**
<i>ZG16</i>	NM_152338.3	zymogen granule protein 16	8,00	0,00191
<i>ITLN1</i>	NM_017625.2	intelectin 1 (galactofuranose binding)	7,73	0,00191
<i>FCGBP</i>	NM_003890.2	Fc fragment of IgG binding protein	5,70	0,00936
<i>REG4</i>	NM_001159352.1	regenerating islet-derived family, member 4	5,21	0,00990
<i>MUC2</i>	NM_002457.3	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	4,04	0,03270
<i>FAM55D</i>	NM_001077639.1	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 4 (NXPE4)	3,85	0,01918
<i>LYPD8</i>	NM_001085474.1	LY6/PLAUR domain containing 8	3,24	0,01588

*FC (*Fold Change log2*); **FDR (Taxa de falsa descoberta).

5.4 Análise de vias enriquecidas com base na lista de genes diferencialmente expressos

Para análise de vias gênicas enriquecidas nas amostras de adenoma e adenocarcinoma na plataforma *MetaCore* (*Thomson Reuters*), foram usados os 689 genes diferencialmente expressos, e seus valores de *fold change*, descritos nas Figuras 11 e 12. As análises foram direcionadas para identificar vias de sinalização enriquecidas e relacionadas com processos celulares e doenças. A figura 19, apresenta as dez vias de sinalização mais enriquecidas, com destaque para as vias de adesão celular, remodelamento de matriz celular e transição epitélio-mesenquimal, além da via de sinalização IGF relacionada com o câncer colorretal.

Figura 19. Principais vias gênicas relacionadas aos 689 genes diferencialmente expressos entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma. As barras em laranja representam os valores de p (MetaCore, 2014).

A via de adesão celular foi a que apresentou maior enriquecimento gênico com um total de dez genes descritos no presente estudo (Figura 20). Na via relacionada com o mecanismo de transição epitélio-mesenchimal foram identificados oito genes (Figura 21). As duas vias estão relacionadas com o mecanismo de metástases, e cinco dos pacientes estudados apresentaram graus distintos de metástase no linfonodo (Anexos –Tabela 5).

Figura 20. Via de adesão celular e remodelamento de matriz extracelular. Os dez genes destacados com linha tracejada estão entre os 689 genes diferencialmente expressos, onde a cor vermelha representa os genes hiperexpressos e a cor azul os genes hipoeexpressos nos adenocarcinomas. Legenda – Anexos - Figura 2.

Figura 21. Via de transição epitélio-mesenquimal. Os oito genes destacados com linha tracejada estão entre os 689 genes diferencialmente expressos, onde a cor vermelha representa os genes hiperexpressos e a cor azul os genes hipoexpressos nos adenocarcinomas. Legenda – Anexos - Figura 2.

Outra via que vale apenas destacar é a via da família IGF, que está diretamente relacionada com o câncer colorretal e contém sete genes do nosso estudo (Figura 22).

Figura 22. Via da família IGF associada ao câncer colorretal. Os sete genes destacados com linha tracejada estão entre os 689 genes diferencialmente expressos, onde a cor vermelha representa os genes hiperexpressos e a cor azul os genes hipoexpressos nos adenocarcinomas. Legenda – Anexos - Figura 2.

Com relação aos processos celulares, a figura 23 descreve os dez processos mais enriquecidos com genes do nosso estudo. A participação de diversos processos celulares associados com o remodelamento de matriz extracelular e angiogênese, corrobora com os dados de vias de sinalização previamente descritas, reforçando a importância desses genes no desenvolvimento tumoral.

Figura 23. Principais processos celulares relacionadas aos 689 genes diferencialmente expressos entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma. As barras em laranja representam os valores de p (MetaCore, 2014).

A terceira e última análise com o conjunto dos 689 genes visou associá-los com doenças. A lista das doenças mais enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre adenoma e adenocarcinomas, destacou quatro doenças ligadas com órgãos do sistema digestório (itens 1, 2, 5 e 6 – Figura 24), sendo uma delas com neoplasia de estômago.

Figura 24. Correlação entre os 689 genes e doenças utilizando a função Biomarcador do MetaCore. As barras em laranja representam os valores de p (MetaCore, 2014).

5.4.1 Seleção do gene para validação funcional

O resultado das análises de expressão diferencial, incluindo *Volcano Plot*, agrupamento hierárquico, e a busca de vias gênicas enriquecidas em amostras de adenocarcinomas resultou numa lista de dezenas de genes associados com o desenvolvimento do adenocarcinoma (Tabelas 2 e 3). Apesar desses genes serem relevantes para a tumorigênese, a maioria deles

não estava com expressão elevada nas dez amostras de adenocarcinoma (Tabela 2). Na tentativa de selecionar um gene com maior peso na tumorigênese, foi elaborada uma lista com genes hiperexpressos nas dez amostras de adenocarcinoma (Tabela 3). Após análise dos 29 genes da tabela, o fator de transcrição *ETV4* foi o que mais chamou atenção, tanto pelas funções que exerce na tumorigênese, quanto pela escassez de informação em relação ao câncer colorretal. Dessa forma, o gene *ETV4* tornou-se o objeto de estudo dos ensaios funcionais.

Figura 25. Expressão relativa do gene *ETV4* após seu silenciamento nas linhagens de câncer colorretal HT29 e HCT15. A) expressão relativa em *fold change*, usando como calibrador a média de amostras de tecido normal de colon. B) Expressão calculada em referência ao endógeno *HPRT1*

Para estudar o papel do *ETV4* na tumorigênese de adenocarcinoma, uma das opções foi avaliar o efeito do silenciamento do gene nos processos ligados a tumorigênese como a proliferação, apoptose e migração celular. Para a avaliação desses processos, as linhagens de câncer colorretal escolhidas foram a HT29 e a HCT15. A análise do nível de expressão do *ETV4* nessas linhagens demonstrou que a linhagem HT29 teve um *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de

aproximadamente 1.5 vezes maior em relação a linhagem HCT15 (Figura 25A) usando como referência as amostras de tecido normal. O cálculo tendo como referência o controle endógeno ($2^{-\Delta Ct}$), revelou uma diferença de expressão de 11 vezes da HT29 em relação a HCT15 (Figura 25B).

5.4.2 Padronização do ensaio de inibição do gene *ETV4*

O ensaio de silenciamento do gene *ETV4*, e do seu controle negativo (esiRNA *EGFP*), foi realizado com 10, 15 e 25 pmol de esiRNA (*pool* de siRNA da *Sigma Aldrich*) (Figura 26). Considerando a maior eficiência de silenciamento, a concentração escolhida para os ensaios funcionais foi a de 10 pmol.

Figura 26. Padronização da concentração do esiRNA *ETV4* para os estudos funcionais nas linhagens HT29 e HCT15 de câncer colorretal.

5.4.3 Abordagem de bioinformática para identificar alvos do gene *ETV4*.

Considerando que o gene *ETV4* é um fator de transcrição, que tem um papel importante na progressão de alguns tumores, incluindo o de colon e reto (Moss *et al.*, 2006), a identificação de genes regulados pelo *ETV4* em nossos dados passou a ser um ponto importante para o maior conhecimento da sua ação na tumorigênese do câncer colorretal. Para esse fim, foi utilizada uma abordagem de bioinformática com dados de Chip-Seq e de expressão gênica em câncer de próstata, publicados por Hollenhorst *et al.* (2011), para identificar genes regulados pelo *ETV4* também em câncer colorretal. A ideia foi usar os dados de Chip-Seq para identificar os genes que apresentavam sítios de ligação para o *ETV4* e avaliar, com os dados de expressão das amostras de Hollenhorst *et al.* (2011), se esses genes apresentavam níveis de expressão elevada. Caso positivo, a pergunta seguinte foi se eles também estão regulados no câncer de colorretal. Após a análise, 58 genes apresentaram regiões de ligação com o gene *ETV4*. Destes, em seis genes a ligação ocorreu na região 3' UTR e em nove na região 5' UTR; nos demais genes a ligação ocorreu na região inter ou intragênica. Dentre os 15 genes com ligações nas regiões 3' e 5' UTR, nove estavam hiperexpressos e seis hipoexpressos (Tabela 7). Três genes foram selecionados para a validação da regulação pelo *ETV4*: *IL8*, *CYR61* e *TNFRSF12A*. O critério usado para a seleção dos genes foi a sua relação com câncer e o nível de expressão elevado. O gene *IL8* não foi observado entre os 58 genes ranqueados, entretanto, sua ativação pelo *ETV4* já foi descrita por Chen *et al.* (2011). No caso dos genes *CYR61* e *TNFRSF12A*, não informações de sua ativação pelo *ETV4*. Na figura 27 é possível observar a

localização da região de ligação do gene *ETV4* com os genes *CYR61* e *TNFRSF12A*.

Tabela 6. Genes com sítios de ligação para o fator de transcrição *ETV4*.

Gene	Cromossomo	Posição cromossômica	
		Inicial	Final
5' UTR			
<i>PLAU</i>	chr10	75668861	75669275
<i>ETV4</i>	chr17	41623305	41623665
<i>CYR61</i>	chr1	86046039	86046443
<i>TRIB3</i>	chr20	361289	361307
<i>ASAP1</i>	chr8	1,31E+08	1,31E+08
<i>ST3GAL4</i>	chr11	1,26E+08	1,26E+08
<i>HSD17B2</i>	chr16	82067476	82067949
<i>BCL2</i>	chr18	60987490	60987980
<i>ADRB2</i>	chr5	1,48E+08	1,48E+08
3' UTR			
<i>SYT1</i>	chr12	79845788	79846165
<i>TNFRSF12A</i>	chr16	3073604	3074099
<i>MYC</i>	chr8	1,29E+08	1,29E+08
<i>ST3GAL1</i>	chr8	1,34E+08	1,34E+08
<i>FOXA1</i>	chr14	38057455	38057944
<i>TNFRSF11A</i>	chr18	60054518	60055005

Os genes em vermelhos estavam hiperexpressos e o em verde hipoexpressos.

Figura 27. Representação da localização dos sítios de *ETV4* nos genes *CYR61* e *TNFRSF12A*. A barras em cor vermelha e azul apontam a posição dos sítios de ligação do gene *ETV4*. A) Ligação na região 5' UTR do gene *CYR61*. B) Indicação de dois sítios de *ETV4* no gene *TNFRSF12A*, uma intragênica e outra na região 3' UTR.

5.4.4 Efeito da inibição do gene *ETV4* na expressão dos genes *CYR61*, *IL8* e *TNFRSF12*

Após o silenciamento do gene *ETV4* (confirmado por RT-qPCR) foram avaliados a expressão dos genes *CYR61*, *TNFRSF12A* e *IL8* nas linhagens HT29 e HCT15. Não houve diferença significativa na redução da expressão de nenhum dos três genes em nenhuma das duas linhagem (Figura 28 e 29).

Figura 28. Silenciamento do gene *ETV4* e sua consequência na expressão dos genes *CYR61*, *TNFRSF12A* e *IL8*. A) Redução significativa da expressão do gene *ETV4* na linhagem HT29. B, C e D): Nenhuma alteração significativa na expressão dos genes *CYR61*, *TNFRSF12A* e *IL8* na linhagem HT29, respectivamente.

Figura 29. Silenciamento do gene *ETV4* e sua consequência na expressão dos genes *CYR61*, *TNFRSF12A* e *IL8*. A) Redução significativa da expressão do gene *ETV4* na linhagem HCT15. B, C e D): Nenhuma alteração significativa na expressão dos genes *CYR61*, *TNFRSF12A* e *IL8* na linhagem HCT15, respectivamente.

5.4.5 Ensaio funcional de apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado para checar a influência do gene *ETV4* sobre a apoptose e morte celular após seu silenciamento. Como pode ser visto na figura 30, não houve qualquer alteração na apoptose e na morte celular das células da linhagem HT29 e consequentemente também não houve alteração na sobrevivência das células. O mesmo resultado não foi observado para morte celular, quando analisado com a linhagem HCT15, que apresentou uma redução significativa.

Figura 30. Ensaio de apoptose. A linhagem HT29 não demonstrou alteração nas taxas de apoptose (A), morte celular (B) e sobrevivência celular (C). No caso da linhagem HCT15 não houve alteração nas taxas de apoptose (D) e sobrevivência celular (F), entretanto, foi observado uma redução significativa na morte celular (E).

5.4.6 Ensaio de proliferação celular.

A leitura de CFSE em resposta ao silenciamentos do gene *ETV4* nas células HT29 e HCT15, foi realizada diariamente por cinco dias consecutivos. Os resultados revelaram redução significativa da proliferação celular somente na linhagem HT29 (figura 31A) e nos tempos de 48h e 72h de cultura. Após as 72h não houve mais diferença de proliferação (Figura 31A e B).

Figura 31. Ensaio de proliferação. O silenciamento do gene *ETV4* mostrou-se eficiente no controle da proliferação celular durante as primeiras 72h de marcação por CFSE nas linhagens HT29 (A) e HCT15 (B).

5.4.7 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado para avaliar a capacidade de células individuais formarem colônias. Foram plaqueadas 100 células tratadas com esiRNA *ETV4* em triplicata e 100 células tratadas como controle negativo, também em triplicata. A contagem do número de colônias foi realizada após 12 dias de cultura. Similarmente ao ensaio de proliferação celular, apenas a linhagem HT29 apresentou redução estatisticamente significativa no número de colônias (Figura 32).

Figura 32. Ensaio clonogênico. Redução na formação do número de colônias na linhagem HT29 (A) mas não na HCT15 (C) após o silenciamento do gene *ETV4*. B e D: Colônias após 12 dias de cultura das linhagens HT29 e HCT15, respectivamente.

5.4.8 Ensaio de migração

O ensaio de migração foi realizado em membrana *transwell* após o silenciamento do gene *ETV4* nas linhagens HT29 e HCT15. A linhagem HT29, apesar de mostrar tendência de redução na capacidade migratória, não demonstrou valor estatístico significativo (Figura 33A). Contrariamente à linhagem HT29, a linhagem HCT15 apresentou aumento significativo na migração celular após o silenciamento do gene *ETV4* (Figura 33B).

Figura 33. Ensaio de migração. A) A linhagem HT29 não sofreu alteração na capacidade migratória das células após silenciamento. B) A linhagem HCT15 apresentou um aumento significativo na migração celular após o silenciamento do gene *ETV4*.

5.5 Pesquisa de mutações nos genes *APC*, *TP53* e *KRAS*

Como descrito previamente na introdução (Figura 4), os genes *APC*, *TP53* e *KRAS*, são críticos para o desenvolvimento do câncer colorretal do tipo esporádico. Nós decidimos investigar se esses genes estavam mutados na coorte estudada e associar com alguns aspectos clínicos dos pacientes. A abordagem usada para a triagem das mutações foi o método de HRM (Anexo-Figura 1) e/ou o sequenciamento pelo método de Sanger.

Foram observadas sete mutações no gene *APC*, sendo seis sinônimas (Y486Y, Q1244Q, T1493T, G1678G, S1756S, P1960P) e uma não sinônima (D1822V). Das sete mutações, seis estavam localizadas no éxon 15 e uma no éxon 11 (Y486Y)(Tabela 7).

As mutações identificadas no gene *APC* foram do tipo germinativas, por estarem presentes em todos tecidos, enquanto que os genes *TP53* e *KRAS* apresentaram mutações do tipo somáticas (Tabela 7). Vale destacar, que três pacientes apresentaram mutações nos genes *TP53* e *KRAS* simultaneamente no adenocarcinoma, e apenas um paciente apresentou mutação no gene *KRAS* no mesmo tipo tumoral. Estes resultados concordam com os dados da literatura, que mostram a deficiência desses genes em tumores avançados de câncer colorretal (Iacopetta, 2003; Smith *et al.*, 2002). A análise de associação das mutações somáticas com a recidiva e sobrevida, pelo método de Kaplan-Meier (Figura 34), não foi significativa. Esse resultado pode ser devido ao baixo número amostral.

Figura 34: Curva Kaplan-Meier para sobrevida e recidiva. As análises de sobrevida (A) e recidiva (B) para os pacientes com mutações nos genes TP53 e KRAS não foram significativas: $p=0,992$ e $p=0,870$, respectivamente. As análises de sobrevida (C) e recidiva (D) para os pacientes com mutações no gene KRAS não foram significativas: $p=0,688$ e $p=0,549$, respectivamente. $p<0,05$.

Tabela 7. Mutações nos genes *APC*, *TP53* e *KRAS* em dez amostras de sangue, tecido normal, adenoma e adenocarcinoma. Os genes *APC*, *TP53* e *KRAS* mostraram uma, quatro e duas mutações não sinônimas respectivamente.

Paciente	<i>APC</i> ¹				<i>TP53</i> ²				<i>K-RAS</i> ³			
	Sangue	T. normal	Ad	Adc	Sangue	T. normal	Ad	Adc	Sangue	T. normal	Ad	Adc
1	Y486Y T1493T S1756S P1960P	Y486Y T1493T S1756S P1960P	Y486Y T1493T S1756S P1960P	Y486Y T1493T S1756S P1960P								
2	Y486Y T1493T G1678G S1756S P1960P	Y486Y T1493T G1678G S1756S P1960P	Y486Y T1493T G1678G S1756S P1960P	Y486Y T1493T G1678G S1756S P1960P	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i> P152L				G12D
3	* * * * *	Y486Y T1493T G1678G S1756S <i>D1822V</i>	Y486Y T1493T G1678G S1756S <i>D1822V</i>	Y486Y T1493T G1678G S1756S <i>D1822V</i>	*				*			G12D
4	T1493T P1960P	T1493T P1960P	T1493T P1960P	T1493T P1960P	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>				
5	Q1244Q T1493T P1960P	Q1244Q T1493T P1960P	Q1244Q T1493T P1960P	Q1244Q T1493T P1960P	P36P	P36P	P36P	P36P R273C				G12D

Continua na próxima página...

Tabela 7. Mutações nos genes *APC*, *TP53* e *KRAS* em dez amostras de sangue, tecido normal, adenoma e adenocarcinoma. Os genes *APC*, *TP53* e *KRAS* mostraram uma, quatro e duas mutações não sinônimas respectivamente. Continuação.

Paciente	<i>APC</i> ¹				<i>TP53</i> ²				<i>K-RAS</i> ³			
	Sangue	T. normal	Ad	Adc	Sangue	T. normal	Ad	Adc	Sangue	T. normal	Ad	Adc
6	Y486Y	*	Y486Y	Y486Y	<i>P72R</i>	*	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>		*		
	T1493T	*	T1493T	T1493T								
	G1678G	*	G1678G	G1678G								
	S1756S	*	S1756S	S1756S								
	P1960P		P1960P	P1960P								
7	Y486Y	Y486Y	Y486Y	Y486Y								
	T1493T	T1493T	T1493T	T1493T								
	G1678G	G1678G	G1678G	G1678G								
	S1756S	S1756S	S1756S	S1756S								
	<i>D1822V</i>	<i>D1822V</i>	<i>D1822V</i>	<i>D1822V</i>								
8	Y486Y	Y486Y	Y486Y	Y486Y								
	T1493T	T1493T	T1493T	T1493T	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>				
	G1678G	G1678G	G1678G	G1678G								
	S1756S	S1756S	S1756S	S1756S								
	P1960P	P1960P	P1960P	P1960P								
9	T1493T	T1493T	T1493T	T1493T	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>				G12A
	P1960P	P1960P	P1960P	P1960P				R273H				
10	Y486Y	Y486Y	Y486Y	Y486Y	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>	<i>P72R</i>				
	T1493T	T1493T	T1493T	T1493T								
	G1678G	G1678G	G1678G	G1678G								
	S1756S	S1756S	S1756S	S1756S								
	<i>D1822V</i>	<i>D1822V</i>	<i>D1822V</i>	<i>D1822V</i>								

¹*APC*: V18822D: rs459552 (tolerada); T1493T: rs411115; Y486Y: rs2229992; Q1244Q: rs74380081; G1678G: rs42427; S1756S: rs866006; P1960P: rs465899.

²*TP53*: P72R: rs1042522 (tolerada); P152L: cm941327 (patogênica); P36P: rs1800370; R273C: rs121913343 (patogênica); R273H: rs28934576 (patogênica).

³*KRAS*: G12D: rs121913529 (patogênica); G12A: rs121913529 (patogênica). *Amostras não amplificaram. T. – tecido; ad – adenoma; adc- adenocarcinoma.

As amostras em itálico são não-sinônimas; As amostras em negrito são somáticas.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Assinatura gênica entre adenoma e adenocarcinoma colorretal

A análise de expressão global dos adenomas e adenocarcinomas revelou uma assinatura de 689 genes (329 hiperexpressos em adenocarcinoma e 360 hiperexpressos em adenoma) diferenciamamente expressos (Figura 12). A validação da expressão dos genes *SFRP4*, *SIM2*, *ESM1*, *IL8*, *OSM*, *IL6*, *ETV4* e *RETNLB*, por RT-qPCR confirmou o valor preditivo dos 689 genes nos dois tipos tumorais (Figura 13). Dos oito genes validados, três deles (*ESM1*, *SIM2* e *ETV4*) foram hiperexpressos nas dez amostras de adenocarcinoma, portanto, são os potenciais candidatos para uso no diagnóstico molecular de adenomas dos adenocarcinomas

Adicionalmente, utilizando um critério estatístico mais rigoroso ($FC > 4$), no mesmo conjunto de dados, foram identificados 111 genes diferencialmente expressos, também com poder de discriminar os adenomas dos adenocarcinomas. A identificação de quatro amostras de adenocarcinoma (adc-3, adc-7, adc-8 e adc-9) com identidade genética similar ao de adenoma, sugere que tais amostras, ainda trazem resquícios das características moleculares de adenomas, ou seja, podem estar num estágio intermediário entre adenoma e adenocarcinoma, ou pré-adenocarcinoma. Este é um dado relevante, pois trata-se de uma evidência molecular da transição adenoma-adenocarcinoma, que suporta a ideia de uma parcela dos adenomas se transformarem em adenocarcinomas (Muto *et al.*, 1975, Shinya & Wolff, 1979). Os nossos achados apontaram para sete genes (*FCGBP*, *REG4*, *NXTE4*,

LYPD8, *ZG16*, *ITLN1* e *MUC2*) que definiram o perfil de expressão típico de adenoma em amostras de adenocarcinomas (Figura 18B). De acordo com a razão de expressão, os genes *FCGBP*, *ZG16*, *ITLN1* e *MUC2* podem conferir maior poder de discriminação.

O gene *FCGBP* expressa uma proteína constituinte da lâmina de muco, que reveste o trato intestinal e atua na linha de frente da resposta imune inata (Kim *et al.*, 2010). A expressão reduzida desse gene foi observada em amostras de câncer de próstata, sugerindo que esse padrão de expressão pode ser um indicador da sua participação na progressão do câncer (Gazi *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado uma interação covalente entre as proteínas dos genes *MUC2* e *FCGBP* para estabilizar a lâmina mucosa do intestino (Johansson *et al.*, 2009). Essa informação reforçaria a importância desses genes no desenvolvimento tumoral.

A hiperexpressão do gene *ITLN1* foi observada em câncer gástrico, entretanto, esse resultado foi correlacionado inversamente com a invasão, metástase e estágio clínico (Zheng *et al.*, 2012), indicando dessa forma que a redução na expressão do gene *ITLN1* poderia potencializar a agressividade tumoral.

O gene *MUC2* tem como função a produção de glicoproteínas mucinosas, que compõe o muco que reveste o intestino. Esse muco atua na lubrificação, hidratação, proteção contra agentes químicos e biológicos (Aksoy *et al.*, 2000). Assim como foi observado em nosso trabalho, Lin *et al.* (2002) encontraram o gene *MUC2* hipoexpresso entre amostras de adenoma e adenocarcinoma colorretal. A diminuição da expressão do gene *MUC2 in vivo* está relacionada à carcinogênese de cólon acompanhada de aumento de

proliferação, diminuição da apoptose e aumento da migração de células epiteliais do intestino (Velcich *et al*, 2002). Não foram encontradas informações na literatura associando o gene *ZG16* ao câncer.

Em resumo, de acordo com os nossos resultados e com os achados dos trabalhos citados, a hipoeexpressão dos genes, *MUC2*, *FCGBP* e *ILTN1* parece ser um fenômeno comum no câncer. Todavia, assim como observado no presente estudo e por Zhang *et al.* (2003), os quatro genes apresentaram níveis de expressão elevada em adenomas, podendo indicar um evento precoce no processo de transição adenoma-adenocarcinoma. Dessa forma, as três amostras caracterizadas histopatologicamente como adenocarcinoma mas com um perfil molecular de adenoma, poderiam estar representando o fim da transformação de um adenoma para o início de um adenocarcinoma, portanto, esses quatro genes podem ser considerados marcadores de transição entre adenoma e adenocarcinoma. Para confirmar essas observações, a expressão desses quatro genes devem ser analisadas em uma amostragem ampliada.

6.2 Identificação de vias gênicas associadas a tumorigênese colorretal

A identificação de vias gênicas associadas ao câncer colorretal, foi realizada no programa MetaCore utilizando os 689 genes diferencialmente expressos entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma. O resultado listou, dentre as vias mais enriquecidas, principalmente as relacionadas com o remodelamento da matriz extracelular e EMT, condições necessárias para o processo metastático, além da via de sinalização *IGF* (Insulin-like growth fator), que está associada diretamente ao câncer colorretal. Os genes *IBPs* (*IGFBP*-

Insulin-like growth factor-binding proteins) controlam a atividade e distribuição das *IGF1* e *2*, via complexos *IGFBP/IGF* (Sitar *et al.*, 2006). Tanto o ligante *IGF1* quanto o *IGF2*, interagem com receptores de membrana para ativar processos biológicos como crescimento celular, proliferação e inibição de apoptose (Yee e Lee, 2000; Sridha e Goodwin, 2008).

A matriz extracelular, assim como a membrana basal, representam uma barreira física à invasão maligna e oferece um ambiente adequado para o crescimento e diferenciação das células, favorecendo desta forma a sobrevivência dos tecidos (Pereira *et al.*, 2005).

Diversos genes observados em nosso estudo pertencem a vias e processos celulares associados com o remodelamento de matriz extracelular, angiogênese e transição epitélio-mesenquimal, e já foram descritos em câncer colorretal ou outros tipos tumorais.

Entre os genes diferencialmente expressos da nossa lista (Tabelas 2 e 3), que inclusive foram utilizados para a validação dos dados de microarranjos, estão os genes *IL6*, *OSM* e *IL8*. O *OSM* e *IL6* já foram descritos em melanomas (Kortylewski *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1993; Lacreusette *et al.*, 2008), câncer de mama (Snyder *et al.*, 2011; West, 2010) e em câncer de próstata (Weiss *et al.*, 2011). Os dois genes utilizam a via de sinalização JAK-STAT, que regulam vários processos biológicos ligados à tumorigênese (Snyder *et al.*, 2011). A participação da *OSM* no desenvolvimento tumoral pode ser observada na figura 22. O gene *IL8* atua nas células endoteliais ativando as vias AKT e MAPK para promover migração, invasão, proliferação e angiogênese em CCR (Ning *et al.*, 2011; Aggarwal, 2013). A *IL8* também pode ser observada atuando nas vias de sinalização das figuras 21 e 23.

O gene *TGFB* induz a transição epitélio-mesenquimal em tumores de mama e próstata. O *TGFB* foi descrito atuando no processo metastático no CCR (Calon *et al*, 2012). Alterações na via do *TGFB* são primeiro detectadas em adenomas avançados e afetam entre 40% - 50% dos CCR (Massagué, 2008).

Também foram observados genes, que apesar de não estarem presentes nas vias identificadas no MetaCore, já foram descritos no câncer colorretal.

Tang *et al.*, (2010), observaram a hiperexpressão do gene *COL10A1* (*Collagen, type X, alpha 1*) em uma análise de expressão global entre amostras de adenoma e adenocarcinoma colorretal, sendo que o aumento de expressão desse gene também foi observado em câncer de mama (Chang *et al.*, 2009), mostrando a importância do colágeno na tumorigênese. O gene *COL1A1* (*Collagen, type I, alpha 1*) foi encontrado hiperexpresso em diversas linhagens e tumores sólidos (Chapman *et al.*, 2012) assim como o *COL18A1* (*Collagen, type XVIII, alpha 1*) relacionado ao risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de mama (Lourenço *et al.*, 2006).

Um outro trabalho de expressão global entre adenoma e adenocarcinoma colorretal também identificou o gene *SPON2* (*Spondin 2*), que codifica uma molécula de adesão presente na matriz extracelular; o gene *RGS16* (*Regulator of G-Protein signalling 16*), que codifica uma proteína que inibe sinal de transdução pelo aumento da atividade de GTPase e o gene *PRKACB* (*Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta*), envolvido na regulação da proliferação, ciclo celular e dinâmica de microtúbulos (Carvalho *et al.*, 2012).

O gene NOX4 está entre os genes de maior expressão nos carcinomas deste trabalho. Graham *et al.*, (2010), demonstraram que a superexpressão de NOX4 em linhagens celulares normal de mama induz a características tumorigênicas incluindo senescência celular.

O gene *ESM1* desempenha um papel chave na regulação da adesão celular, desordens inflamatórias e progressão tumoral (Kang *et al.*, 2011). Associado com o *IGF* promove crescimento celular e proliferação, e sua expressão é induzida por *TNFA* e *IL1B* (Sarrazin *et al.*, 2006). Assim como em nosso trabalho, a hiperexpressão desse gene já foi observada em câncer renal e de pulmão (Grigoriu *et al.*, 2006; Rennel *et al.*, 2007).

Pouco se conhece sobre a função do gene *SIM2* em humanos, mas uma possível relação com o câncer seria sua habilidade em regular transcrionalmente enzimas metabólicas chave para inativação da carcinogênese (Hankinson, 1995). No CCR foi descrito a participação deste gene na diferenciação e apoptose (Aleman *et al.*, 2005). Em glioblastomas ele foi relacionado com invasão (He *et al.*, 2009) e em próstata poderia estar envolvido com a origem e evolução do câncer (Lu *et al.*, 2011).

Em razão do uso de diferentes plataformas de microarranjos e a aplicação de diferentes métodos estatísticos, uma análise comparativa simples não é cientificamente correta para apontar os genes que realmente possam ser utilizados na prática clínica como biomarcadores. Por essa razão, dois grupos de pesquisa (Chan *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2011) aplicaram abordagens de meta-análise comparando diversos trabalhos de expressão de microarranjos entre amostras de tecido normal, adenoma e adenocarcinoma ou somente entre tecido normal e adenocarcinoma, na tentativa de identificar genes com um alto

potencial para o uso na prática médica. Vários genes identificados nestes trabalhos também foram observados em nosso estudo como os genes: *CA2* (*Carbonic anhydrase II*), *FCGBP* (*Fc fragment of IgG-binding protein*), *CLU* (*Clusterin*), *CA1* (*Carbonic anhydrase I*), *TGFB1* (*Transforming growth factor- β induced*), *MYC* (*V-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue*), *SPARC* (*Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)*), *COL1A2* (*Collagen, type I, $\alpha 2$*), *INHBA* (*Inhibin, βA*), *MMP11* (*Matrix metalloproteinase 11, stromelysin 3*), *CSE1L* (*CSE1 chromosome segregation 1-like*), *COL3A1* (*Collagen, type III, $\alpha 1$*), *COL4A1* (*Collagen, type IV, $\alpha 1$*) e *ETV4* (*Ets variant 4*), entre outros.

A sobreposição dos genes observados nos trabalhos de meta-análise com os encontrados no nosso estudo não somente reforça a importância desses genes para o desenvolvimento do CCR como demonstra a qualidade técnica das nossas análises.

6.3 Instabilidade cromossômica no CCR

Usando o programa GSEA, foi avaliada a posição cromossômica dos 689 genes diferencialmente expressos em regiões de instabilidade cromossômica. As variações do número de cópias (CNVs – *Copy Number Variations*), como amplificações e perdas cromossômicas, desempenham um importante papel na progressão do CCR. Foram encontradas quatro regiões cromossômicas com maior número de genes diferencialmente expressos entre adenoma-adenocarcinoma colorretal (Tabela 8).

Tabela 8. Regiões cromossômicas com maior enriquecimento gênico.

Posição cromossômica	nº de genes	Valor de <i>p</i>
20q13	18	3,31E-07
20q11	10	5,34E-06
4p14	4	2,47E-03
4q21	7	4,20E-03

A amplificação da região 20q é observado em >65% dos cânceres de cólon e reto (Korn *et al.*, 1999). Ganhos do 20q são também comuns em outros tipos tumorais e têm sido associados com uma pobre resposta em câncer gástrico e colorretal (Carvalho *et al.*, 2009). Com exceção do gene *BCAS1*, todos os genes para as duas regiões do cromossomo 20 estavam hiperexpressos nos adenocarcinomas em relação aos adenomas. Já os quatro genes da região cromossômica 4p14 estavam hipoexpressos no adenocarcinoma e dos sete genes encontrados no cromossomo 4q21, quatro estavam hiperexpressos e três hipoexpressos nos adenocarcinomas. Na tabela 4 dos anexos, estão citados os 39 genes localizados nestas quatro regiões cromossômicas.

Dois genes localizados na região 20q chamaram a atenção por serem focos de estudo em outros trabalhos. *TPX2* (*Microtubule-associated, homolog* (*Xenopus laevis*)) é um parceiro de ligação da *AURKA* (*Aurora kinase A*) e é requerido para posicioná-la no fuso dos microtúbulos e estimular sua atividade. *AURKA* é utilizada para a formação do fuso mitótico e controle da segregação cromossômica. Os genes *AURKA* e *TPX2* foram descritos por Carvalho *et al.* (2009) e Sillars-Hardebol *et al.* (2011) como genes direcionadores da progressão adenoma-adenocarcinoma, além disso, é conhecido que *AURKA* e *TPX2* interagem diretamente, assim Asteriti *et al.*, (2010) propuseram que estes

dois genes formam uma unidade funcional com propriedades oncogênicas, especialmente quando ambos estão hiperexpressos.

Sillars-Hardebol *et al.* (2011) acreditam que o ganho no cromossomo 20q possa ser usado como um marcador molecular para o diagnóstico precoce da maioria das lesões clinicamente relevantes para tumores de cólon que são a minoria dos adenomas com potencial para progredir para carcinomas.

Outros genes como o *CSE1L* (*Chromosome segregation 1-like*) e o *DIDO1* (*Death inducer-obliterator*), também localizados na região 20q, parecem estar envolvidos na progressão adenoma-adenocarcinoma, entretanto, com uma função menos significativa do que os descritos anteriormente (Sillars-Hardebol *et al.* 2012b).

De acordo com todas as informações descritas até o presente momento, fica claro que os dados deste trabalho corroboram fortemente com a literatura. A maior parte dos genes relacionados pelo MetaCore mostrou um grande envolvimento de genes associados à matriz extracelular, fortemente ligados ao desenvolvimento do câncer, especialmente à invasão. Além disso, a região 20q deve ser considerada peça fundamental na progressão adenoma-adenocarcinoma. Apesar deste trabalho não focar na análise cromossômica e não ter dados sobre deleção e amplificação de regiões cromossômicas, é relevante comentar que todos os genes desta região com exceção de um (*BCAS1*) estavam hiperexpressos e isto poderia ser em função de uma amplificação neste cromossomo. Já a explicação para o *BCAS1* poderia estar relacionada com outro tipo de regulação como a epigenética ou por miRNAs.

6.4 Validação funcional do gene *ETV4*

Nossas análises de microarranjos colocaram o gene *ETV4* entre aqueles com maior expressão nos adenocarcinomas. Além disso, ele também se mostrou hiperexpresso nas amostras de câncer dos dez pacientes. Esses dados sugerem um papel importante do *ETV4* no CCR, que por essa razão foi selecionado para os estudos funcionais.

A identificação do oncogene v-ets do vírus da leucemia aviária, E26, em 1983, levou à descoberta de uma grande família de genes conservados, isolados a partir de espécies filogeneticamente divergentes de *Drosophila* e *C. elegans* a humanos (Hsu *et al.*, 2004). Baseado na homologia com o oncogene E26, foi identificado o primeiro *ETS*, nomeado *ETS1* (Wei, *et al.*, 2010).

O gene *ETV4* (*E1AF/PEA3 – ets variant 4*), pertence a uma família de fatores de transcrição que dividem um único domínio de ligação com o DNA, o domínio ets. Todos os membros da família *ETS* tem uma sequência de aminoácidos altamente conservada em uma região de 84 a 90 resíduos conhecida como domínio ets. Esta região de aminoácidos forma o domínio de ligação ao DNA *winged helix-turn-helix* composta de três alfa-hélices e uma folha beta pregueada que reconhece a sequência núcleo GGAA/T (Deves *et al.*, 2011). As 28 proteínas humanas *ETS* são agrupados em 12 subgrupos. Enquanto 25 fatores *ETS* são agrupados em nove subfamílias com dois ou três membros, três proteínas *ETS* são altamente divergentes, com uma delas (*ETV2/ER71*) não partilhando homologia com nenhuma outra proteína conhecida fora do seu domínio de ligação ao DNA (Oh *et al.*, 2012).

Os membros da família *ETS* são descritos como participantes no desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, migração, remodelamento do tecido, invasão e angiogênese em diferentes tipos de câncer (Galang *et al.*, 2004; Hashiya *et al.*, 2004; Hahne *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

Para compreender o papel do *ETV4* no câncer colorretal, foram realizados ensaios funcionais de apoptose, proliferação, clonogênico e migração nas linhagens HT29 e HCT15.

Nossa tentativa em validar os genes *CYR61* e *TNFRSF12A* como alvos do gene *ETV4* não obteve sucesso, pois não houve alteração na expressão desses genes após o silenciamento do *ETV4* (Figura 28 e 29). Também não foi observada alteração nos níveis de apoptose e morte celular na linhagem HT29 (Figura 30). Entretanto, a linhagem HCT15 apresentou uma redução significativa na morte celular. Esse resultado poderia indicar a ação indireta do gene *ETV4* sobre outros genes.

O ensaio de proliferação respondeu significativamente à inibição do gene *ETV4* para a linhagem HT29, mas não mostrou alteração para a HCT15. A redução da proliferação já foi demonstrada em alguns trabalhos, inclusive com câncer colorretal (Moss *et al.*, 2006; Pellecchia *et al.*, 2012). Hollenhorst *et al.*, (2011), demonstraram em linhagem de câncer de próstata, que a inibição do *ETV4* levou a uma diminuição da expressão em três genes relacionados ao ciclo celular e proliferação (*MYC*, *CHECK1*, *MCM7*) e que inclusive o gene *MYC* sofreu regulação direta do *ETV4*.

Yuen *et al.* (2011), ao analisarem a redução da proliferação após a inibição do *ETV4* em câncer de esôfago, também verificaram uma queda na

concentração da forma ativa fosforilada da proteína AKT. A via AKT tem papel importante na regulação de processos celulares como crescimento celular, proliferação, metabolismo e apoptose (Altomare e Testa, 2005).

O ensaio clonogênico também apresentou redução na formação de colônias após a inibição do *ETV4* na linhagem HT29, entretanto, o mesmo não foi observado na linhagem HCT15. Esse resultado corrobora com os trabalhos de Clementz *et al.* 2011 em câncer de mama e o de Yuen *et al.* (2011) em câncer de esôfago e reforça a relevância desse gene para a proliferação no câncer, visto que o ensaio clonogênico tem a função de avaliar a capacidade de uma célula proliferar e formar colônias.

Em contraste com a literatura envolvendo outros tipos de cânceres (Kaya *et al.*, 1996; Hida *et al.*, 1997), nosso ensaio de migração mostrou um aumento da taxa de migração para a linhagem HCT15 e uma tendência de redução não significativa na HT29. Em um estudo realizado por Pellecchia *et al.* (2012), foi verificado uma diminuição da capacidade migratória na linhagem PC3 de câncer de próstata após a inibição do *ETV4*, mas o mesmo não ocorreu na linhagem DU145. Após o silenciamento do *ETV4* a expressão de *MMP1*, *MMP3* e *MMP9* também reduziu, fato não observado na DU145, sugerindo que nestas células o mecanismo de regulação das MMPs é diferente. É importante ressaltar que estudos prévios mostraram a ação do *ETV4* na ativação de múltiplos genes *MMP* (*matrix metallopeptidase*), tais como *MMP1*, *MMP3* e *MMP9*, desempenhando um importante papel na invasão tumoral pela degradação da matriz extracelular (Horiuchi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007). Isso poderia explicar os resultados obtidos em nosso trabalho. Apesar da expressão de *MMPs* não ter sido analisada, elas poderiam justificar

a ação de um mecanismo alternativo nestas linhagens, ou ainda, a resposta da inibição do *ETV4* em câncer colorretal ser diferente de outros cânceres.

Nossos dados mostraram que a proliferação é o processo celular mais afetado pelo gene *ETV4* em câncer colorretal. Entretanto, a ampliação desses ensaios para outras linhagens, pode expandir o conhecimento do papel desse gene em CCR.

6.5 Triagem de mutações dos genes *APC*, *TP53* e *KRAS*

Em 1990, Fearon e Volgestein propuseram um modelo genético para o desenvolvimento do câncer colorretal, no qual o adenocarcinoma evolui de um adenoma pelo acúmulo de mutações em oncogenes e genes de supressão tumoral, mais especificamente os genes *APC*, *DCC*, *KRAS* e *TP53*.

Entretanto, desde então, alguns trabalhos têm analisado a presença de mutações nestes genes e na maioria dos casos o acúmulo de mutações não é observado na carcinogênese colorretal (Smith *et al.*, 2002; Colin *et al.*, 2005; Palacio-Rúa *et al.*, 2014). O mesmo resultado foi observado em nossos dados, no qual nenhum paciente apresentou as três mutações simultaneamente.

O gene *APC* compreende 15 éxons, dos quais o éxon 15 codifica mais de 50% da proteína (Ficari *et al.*, 2000). Entre 60 e 80% dos adenomas e adenocarcinomas colorretais carregam mutações no *APC* (Nagel *et al.*, 2002) e, embora a região de cluster mutacional (MCR) entre os códons 1286-1513 no éxon 15 represente somente 8% dos 8535 pares de bases do gene *APC*, entre 68-77% das mutações somáticas ocorrem nesta região e apresentam 76% de todas as mutações descritas em adenomas para o gene *APC* (Lüchtenborg *et*

al., 2004; Voorham *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos observaram uma alta frequência de alterações no gene *APC* (Miyoshi *et al.*, 1992; Rowan *et al.*, 2000; Egan *et al.*, 2008), mas em contraste, não encontramos nenhuma mutação somática no *APC*, apesar do alto número de polimorfismos germinativos o que poderia ser explicado pelo pequeno número de amostras (10). Além disso, de acordo com Guerreiro *et al.* (2007), a presença de polimorfismos germinativos não modifica o risco para o desenvolvimento da doença.

A maioria das mutações do gene *TP53* são substituições missense (75%) dentro de domínios de ligação do DNA (éxons 5-8) levando a perda da função de transativação (Bastien *et al.*, 2008). Em cânceres esporádicos, cerca de 25% das mutações são encontradas em áreas altamente mutadas dentro dos códons 175, 245, 248, 249, 273 e 282 (Olivier *et al.*, 2002).

O gene *TP53* apresentou três diferentes mutações somáticas não sinônimas (P152L, R273H e R273C) em 30% dos indivíduos. A mutação P152L já foi observada em outros trabalhos (Rines *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 2002) todavia, não há informações sobre sua relevância na tumorigênese, diferentemente do códon 273, que é considerado um dos cinco “hotspots” do *TP53* e que juntos somam aproximadamente 43% de todas as mutações deste gene (Iacopetta, 2003). Os polimorfismos R273H e R273C já foram relacionadas com proliferação, invasão e migração em câncer de mama, pulmão e endométrio (Dong *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014).

Não foram observadas alterações somáticas nos adenomas, o que poderia ser explicado pelo fato de que mutações no *TP53* são um evento tardio na progressão da doença.

Mutações no gene *KRAS* são essencialmente causadas por substituições nos códons 12, 13 e 61 (Simi *et al.*, 2008). Aproximadamente 40% dos cânceres colorretal apresentam mutações no *KRAS* e 90% dessas mutações ocorrem nos códons 12 e 13 (Imamura *et al.*, 2012).

A mutação G12D foi encontrado em três pacientes e o G12A em apenas um, entretanto, não foi detectada nenhuma alteração no códon 13 que costuma estar alterado em uma frequência mais baixa do que o códon 12 (Andreyev *et al.*, 1998). As mutações G12A e G12D são consideradas patogênicas e já foram associadas com o desenvolvimento, agressividade e à falta de resposta à terapia *EGFR* em câncer colorretal (Shuangshoti, 2011; Improta *et al.*, 2013).

A análise da curva Kaplan-Meier para sobrevida e recidiva, foi realizada com os pacientes que apresentaram mutações somáticas. As análises foram feitas associando os genes *TP53* com o *KRAS* e somente com o *KRAS*. Os resultados não foram significativos. Tanto a ausência de mutações somáticas no gene *APC*, quanto a falta de associação entre as mutações e a clínica do pacientes, poderia ser explicada pelo baixo número amostral do nosso estudo. Portanto, a análise em uma coorte maior composta de amostras de tecido normal, adenoma e adenocarcinoma do mesmo paciente poderia indicar mutações com participação mais decisiva na origem e progressão do câncer colorretal.

6.5 Considerações Finais

O conjunto de resultados de expressão diferencial, análises de vias gênicas, bem como de CNVs, e ainda de ensaios funcionais do gene *ETV4*,

gerados com amostras de adenocarcinomas pareadas com os adenomas dos mesmos pacientes, confirmou alguns achados presentes na literatura recente e revelou dados originais como uma assinatura de expressão de quatro genes (*FCGBP*, *ITLN1*, *MUC2* e *ZG16*) que pode indicar o estágio pré-adenocarcinoma. Esse dado é considerado o achado mais importante do presente estudo, pois é a primeira evidência molecular do mecanismo de transição adenoma/adenocarcinoma de uma parcela dos CCR.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- 1- *Estabeecer uma assinatura gênica que possa diferenciar o adenoma do adenocarcinoma;*

A análise de expressão gênica entre dez pares de adenoma e adenocarcinoma colorretal identificou 689 genes diferencialmente expressos. Esse conjunto de genes estabeleceu uma assinatura gênica capaz de diferenciar adenoma de adenocarcinoma colorretal.

- 2- *Identificação de vias gênicas mais enriquecidas com genes diferencialmente expressos em adenoma e adenocarcinoma;*

As vias de sinalização associadas a adesão celular, remodelamento de matriz extracelular e transição epitélio-mesenquimal, foram as que apresentaram maior enriquecimento gênico após análise com os 689 genes diferencialmente expressos. Esses dados validam a assinatura gênica identificada em nosso estudo, visto a importância da associação desses genes no desenvolvimento tumoral.

- 3- *Selecionar genes dentro das vias mais enriquecidas para validação funcional;*

O gene *ETV4* foi um dos genes com maior expressão diferencial entre as amostras de adenoma e adenocarcinoma, além de também estar hiperexpressos nas dez amostras de adenocarcinoma. Sua função na proliferação e invasão de alguns tipos de cânceres já foi descrita e nossos

dados mostraram que a proliferação celular pode estar associada a ação desse gene no câncer colorretal.

4- Adicionalmente, investigar mutações nos genes APC, K-RAS e TP53, e associar com a evolução clínica dos pacientes.

A investigação de mutações, não identificou nenhuma mutação somática no gene *APC*. As mutações somáticas observadas nos genes *TP53* e *KRAS*, apesar de patogênicas, não apresentaram correlação com a clínica dos pacientes. Tanto o baixo número de mutações somáticas quanto a ausência de correlação com os dados clínicos, provavelmente esteja relacionada ao baixo número amostral.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÀMOFF MD, MAGALHÃES PJ, RAM SJ. (2004). Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, 11(7):36–42.
- AGGARWAL I. (2013). Targeting the Interleukin-8 Signaling Pathway in Colorectal Cancer: A Mini-review. **Journal of Young Investigators**, 25(8):108-111.
- AKSOY N, CORFIELD AP, PARASKEVA C, THORNTON DJ, SHEEHAN JK. (2000). Alterations of MUC2 Mucin in Colorectal Adenocarcinoma. **Turk J Med Sci**, 30: 359-365.
- ALEMAN MJ, DEYOUNG MP, TRESS M, KEATING P, PERRY GW, et al. (2005) Inhibition of Single Minded 2 gene expression mediates tumor-selective apoptosis and differentiation in human colon cancer cells. **PNAS**, 102(36): 12765–12770.
- AL-SOHAILY S, BIANKIN A, LEONG R, KOHONEN-CORISH M, WARUSAVITARNE J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 27:1423–1431.
- ALTOMARE DA, TESTA JR. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene** (2005) 24:7455–7464.
- ARENDS MJ. (2013). Pathways of colorectal carcinogenesis. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 21(2):97-102.
- ARMAGHANY T, WILSON JD, CHU Q, MILLS G. (2012). Genetic Alterations in Colorectal Cancer. **Gastrointest Cancer Res**, 5:19–27.
- ASHKTORAB H, DAREMIPOURAN M, GOEL A, VARMA S, LEAVITT R *et al.*. (2013). DNA methylome profiling identifies novel methylated genes in African American patients with colorectal neoplasia. **Epigenetics**, 9 (4):1-10.
- ASTERITI IA, RENSEN WM, LINDON C, LAVIA P, GUARGUAGLINI G. (2010). The Aurora-A/TPX2 complex: A novel oncogenic holoenzyme? **Biochimica et Biophysica Acta**, 1806: 230–239.
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.**
<http://AtlasGeneticsOncology.org>.
- AYTES A, MITROFANOVAB A, KINKADEA CW, LEFEBVREB C, LEIB M, *et al.* (2013). ETV4 promotes metastasis in response to activation of PI3-kinase and Ras signaling in a mouse model of advanced prostate cancer. **PNAS**, E3506–E3515.

- BASTIEN R, LEWIS TB, HAWKES JE, QUACKENBUSH JF, ROBBINS TC, *et al.*, (2008). High-Throughput Amplicon Scanning of the *TP53* Gene in Breast Cancer Using High-Resolution Fluorescent Melting Curve Analyses and Automatic Mutation Calling. **Human Mutation**, 29(5): 757-764.
- BENJAMINI Y, HOCHBERG Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, 57:289-300.
- BOGAERT J, PRENEN H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. **Annals of Gastroenterology**, 2:9-14.
- BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESHLEMAN JR *et al.* (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Research**, 58:5248–5257.
- BOLSTAD BM, IRIZARRY RA, ASTRAND M, SPEED TP. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. **Bioinformatics**, 19:185-193.
- BRINK M, DE GOEIJ AF, WEIJENBERG MP, ROEMEN GM, LENTJES MH. *Et al.* (2003). K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. **Carcinogenesis**, 24(4):703-10.
- BUDINSKA E, POPOVICI V, TEJPAR S, D'ARIO G, LAPIQUE N, *et al.* (2013). Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. **Journal of Pathology**, 231:63–76.
- CALON A, ESPINET E, PALOMO-PONCE S, TAURIELLO DV, IGLESIAS M *et al.* (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. **Cancer Cell**, 22(5):571-84.
- CARVALHO B, POSTMA C, MONGERA S, HOPMANS E, DISKIN S, *et al.*. (2009). Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression. **Gut**, 58: 79–89.
- CARVALHO B, SILLARS-HARDEBOL AH, POSTMA C, MONGERA S, DROSTE JTS, *et al.*. (2012). Colorectal adenoma to carcinoma progression is accompanied by changes in gene expression associated with ageing, chromosomal instability, and fatty acid metabolism. **Cell Oncol**, 35:53–63.
- CHAN SK, GRIFFITH OL, TAI IT, JONES SJM. (2008). Meta-analysis Of Colorectal Cancer Gene Expression Profiling Studies Identifies Consistently Reported Candidate Biomarkers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 17(3): 543-552.

- CHANG HJ, YANG MJ, YANG YH, HOU MF, HSUEH *et al.* (2009). MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. **Oncol Rep**, 22(5):1119-27.
- CHAPMAN KB, PRENDES MJ, STERNBERG H, KIDD JL, FUNK WD, *et al.* (2012). COL10A1 expression is elevated in diverse solid tumor types and is associated with tumor vasculature. **Future Oncol.**, 8(8): 1031-40.
- CHEN Y, CHEN L, LI JY, MUKAIDA N, WANG Q *et al.* (2011). ER β and PEA3 co activate IL-8 expression and promote the invasion of breast cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, 11(5): 497-511.
- CHRISTODOULOU S, ALEXOPOULOU DK, KONTOS CK, SCORILAS A, PAPADOPOULOS IN. (2014). Kallikrein-related peptidase-6 (KLK6) mRNA expression is an independent prognostic tissue biomarker of poor disease-free and overall survival in colorectal adenocarcinoma. **Tumor Biol.**
- Chromas Lite version 2.1** (2012), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.
- CLARK JC, COLLAN Y, EIDE TJ, ESTÈVE J, EWEN S, *et al.* (1985). Prevalence of polyps in an autopsy series from areas with varying incidence of large-bowel cancer. **Int J Cancer**, 36(2):179-86.
- CLEMENTZ AG, ROGOWSKI A, PANDYA K, MIELE L, OSIPO C. (2011). NOTCH-1 and NOTCH-4 are novel gene targets of PEA3 in breast cancer: novel therapeutic implications. **Breast Cancer Research**, 13:R63.
- COLUSSI D, BRANDI G, BAZZOLI F, RICCIARDIELLO L. (2013). Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. **Int. J. Mol. Sci.**, 14:16365-16385.
- CRANLEY JP, PETRAS RE, CAREY WD, PARADIS K, SIVAK MV. (1986). When is endoscopic polypectomy adequate therapy for colonic polyps containing invasive carcinoma? **Gastroenterology**, 91(2):419-27.
- DAVIES RJ, MILLER R, COLEMAN N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. **Nature Reviews Cancer**, 5: 199-209.
- de LA CHAPELLE A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, 4: 769-780.
- DE ROOCK W, BIESMANS B, DE SCHUTTER J, TEJPAR S. (2009). Clinical biomarkers in oncology: Focus on colorectal cancer. **Molecular diagnosis & Therapy**, 13(22):103-114.

- de WIT M DE, JIMENEZ CR, CARVALHO B, BELIEN JAM, DIEMEN PMD-van *et al.* (2012). Cell surface proteomics identifies glucose transporter type 1 and prion protein as candidate biomarkers for colorectal adenoma-to-carcinoma progression. **Gut**, 61:855-864.
- DESCHOOLMEESTER V, BOECKX C, BAAY M, WEYLER J, WUYTS W, *et al.* (2010). *KRAS* mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. **British Journal of Cancer**, 1-10
- DEVES C, RENCK D, GARICOCHEA B, SILVA VD, LOPES TG *et al.* (2011). Analysis of select members of the E26 (ETS) transcription factors family in colorectal cancer. **Virchows Arch**, 458:421–430
- EGAN JB, JACOBS ET, MARTÍNEZ ME, GERNER EW, JURUTKA PW, *et al.* (2008). Presence of a TA Haplotype in the *APC* Gene Containing the Common 1822 Polymorphism and Colorectal Adenoma. **Cancer Research**, 68(14): 6006-6013.
- FASSINA A, GAZZIERO A, ZARDO D, CORRADIN M, ALDIGHERI E, ROSSI GP. (2009). Detection of EGFR and *KRAS* mutations on transthoracic needle aspiration of lung nodules by high resolution melting analysis. **J Clin Pathol**, 62:1096–1102.
- FEARON EF, VOGELSTEIN B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767.
- FICARI F, CAMA A, VALANZANO R, CURIA MC, PALMIROTTA R, *et al.*, (2000). *APC* gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. **British Journal of Cancer**, 82(2), 348–353.
- FORD CE, JARY E, MA SSQ, NIXDORF S, HEINZELMANN-SCHWARZ VA, *et al.* (2013) The Wnt Gatekeeper SFRP4 Modulates EMT, Cell Migration and Downstream Wnt Signalling in Serous Ovarian Cancer Cells. **PLoS ONE**, 8(1): e54362.
- GALANG CK, MULLER WJ, FOOS G, OSHIMA RG, HAUSER CA. (2004). Changes in the Expression of Many Ets Family Transcription Factors and of Potential Target Genes in Normal Mammary Tissue and Tumors. **The journal of biological chemistry**, 279 (12): 11281–11292.
- GAO Y, LI C, NIE M, LU Y, LIN S *et al.* (2014). CXCR4 as a novel predictive biomarker for metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. **Tumor Biol**.
- GARCÍA-BILBAO A, ARMAÑANZAS R, ISPIZUA Z, CALVO B, ALONSO-VARONA A, *et al.* (2012). Identification of a biomarker panel for colorectal cancer diagnosis. **BMC Cancer**, 12:43.

- GAZI MH, HE M, CHEVILLE JC, YOUNG CYF. (2008). Downregulation of IgG Fc binding protein (FcγBP) in prostate cancer. **Cancer Biology & Therapy**, 7(1):, 70-75.
- GENTLEMAN RC, CAREY VJ, BATES DM, BOLSTAD B, DETTLING M *et al.* (2004). Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics R. **Genome Biology** , 5(10):R80.
- GOLDSTEIN J, TRAN B, ENSOR J, GIBBS P, WONG HL *et al.*, (2014). Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). **Annals of Oncology Advance**.
- GRADY WM, RAJPUT A, MYEROFF L, LIU DF, KWON K. (1998). Mutation of the Type II Transforming Growth Factor Beta Receptor Is Coincident with the Transformation of Human Colon Adenomas to Malignant Carcinomas. **Cancer Research**, 58:3101-3104.
- GRAHAM KE, KULAWIEC M, OWENS KM, LI X, DESOUKI MM, *et al.*. (2010). NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. **Cancer Biology & Therapy**, 10(3): 223-231.
- GraphPad Software.** v.5.01 para Windows, San Diego California USA, www.graphpad.com.
- GUERREIRO CS, CRAVO ML, BRITO M, VIDAL PM, FIDALGO PO. (2007). The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons. **Am J Clin Nutr** 85:1592–1597.
- GRIGORIU BD, DEPONTIEU F, SCHERPEREEL A, GOURCEROL D, DEVOS P, *et al.* (2006). Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**. 12(15):4575-82.
- HAHNE JC, OKUDUCU AF, KAMINSKI A, FLORIN A, SONCIN F *et al.*. (2005). Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth. **Oncogene**, 24: 5384–5388.
- HALF E, BERCOVICH D, ROZEN P. (2009). Familial adenomatous polyposis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, 4: 22.
- HANKINSON O. (1995). The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 35: 307-340.
- HASHIYA N, JO N, AOKI M, MATSUMOTO K, NAKAMURA T *et al.*. (2004). In Vivo Evidence of Angiogenesis Induced by Transcription Factor Ets-1: Ets-1 Is Located Upstream of Angiogenesis Cascade. **Circulation**, 109: 3035-3041.

- HE Q, LI G, SU Y, SHEN J, LIU Q, *et al.* (2010). Single minded 2-s (SIM2-s) gene is expressed in human GBM cells and involved in GBM invasion. **Cancer Biology & Therapy**, 9(6):430-436.
- HERMAN JG, UMAR A, POLYAK K, GRAFF JR, AHUJA N. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 95, 6870–6875.
- HERMSEN M, POSTMA C, BAAK J, WEISS M, RAPALLO A *et al.*. (2002) Colorectal Adenoma to Carcinoma Progression Follows Multiple Pathways of Chromosomal Instability. **Gastroenterology**, 123:1109–1119.
- HIDA K, SHINDOH M, YOSHIDA K, KUDOH A, FURAOKA K *et al.* (1997). Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, 33(6):426-30.
- HINOUE T, WEISENBERGER DJ, LANGE CPE, SHEN H, BYUN H-M, *et al.* (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. **Genome Res**, 22: 271-282.
- HISAMUDDIN IM, YANG VW. (2006). Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. **Current Colorectal Cancer Reports**, 2: 53–59.
- HOFF G, FOERSTER A, VATN MH, SAUAR J, LARSEN S. (1986). Epidemiology of polyps in the rectum and colon. Recovery and evaluation of unresected polyps 2 years after detection. **Scand J Gastroenterol.**, 21(7):853-62.
- HOLLENHORST PC, FERRIS MW, HULL MA, CHAE H, KIM S *et al.*. (2011). Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. **Genes & development**, 25: 2147–2157.
- HOORNAERT S, HANON E, LYAKU J, PASTORET PP. (1997). The Use of Annexin for Concomitant Detection of Apoptosis and Cellular Phenotype. **Biochemica**, 3:19-20.
- HORIUCHI S, YAMAMOTO H, MIN Y, ADACHI Y, ITOH F. (2003). Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. **Journal of Pathology**, 200: 568–576.
- HSIEH P, YAMANE K. (2008). DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev**, 129(7-8):391–407.
- HSU T, TROJANOWSKA M, WATSON DK. (2004). Ets Proteins in Biological Control and Cancer. **J Cell Biochem**, 91(5): 896–903.

- IMAMURA Y, MORIKAWA T, LIAO X, LOCHHEAD P, KUCHIBA A *et al.*, (2012). Specific Mutations in *KRAS* Codons 12 and 13, and Patient Prognosis in 1075 BRAF Wild-Type Colorectal Cancers. **Clin Cancer Res**, 1–11.
- IMPROTA G, ZUPA A, POSSIDENTE L, TARTARONE A, PEDICINI P *et al.*, (2013). Coexistence of two different mutations in codon 12 of the *KRAS* gene in colorectal cancer: Report of a case supporting the concept of tumoral heterogeneity. **Oncology letters** 5: 1741-1743.
- INCA. (2004). **TNM: classificação de tumores malignos**. 6ed. Rio de Janeiro: 254p.
- INCA. (2014). **Estimativa 2014 : incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. Acessado em: 12-07-2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=>
- IARC. (2014). **International Agency for Research on Cancer**. Acessado em: 12-07-14. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- JAIN KK. (2007). Cancer biomarkers: current issues and future directions. **Curr Opin Mol Ther.**, 9(6):563-71.
- JASS JR. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology**, 50:113–130.
- JOHANSSON ME, THOMSSON KA, HANSSON GC. (2009). Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. **J Proteome Res.**, 8(7):3549-3557.
- JÖNSSON M, EKSTRAND A, EDEKLING T, EBERHARD J, GRABAU D. *et al.* (2009). Experiences from treatment-predictive *KRAS* testing; high mutation frequency in rectal cancers from females and concurrent mutations in the same tumor. **BMC Clinical Pathology**, 9:8.
- JUNG B, DOCTOLERO RT, TAJIMA A, *et al.* (2004). Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers. **Gastroenterology**, 126(3):654–659.
- JUNG Y, LEE S, CHOI H-S, KIM S-N, LEE E. *et al.* (2011). Clinical Validation of Colorectal Cancer Biomarkers Identified from Bioinformatics Analysis of Public Expression Data. **Clin Cancer Res.**, 17(4):700–709.

- KANG YH, JI NY, LEE CI, LEE HG, KIM JW, *et al.* (2011). ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. **Amino Acids**. 40(3):1003-1013.
- KAUFFMANN A, GENTLEMAN R, HUBER W. (2009). arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. **Bioinformatics**, 25(3):415-416.
- KAYA M, YOSHIDA K, HIGASHINO F, MITAKA T, ISHII S *et al.* (1996). A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. **Oncogene**, 12(2):221-227.
- KIM JT, HO SB. (2010). Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. **Curr Gastroenterol Rep.**, 12:319–330.
- KORN WM, YASUTAKE T, KUO WL, WARREN RS, COLLINS C, *et al.* (1999). Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**, 25(2): 82-90.
- KORTYLEWSKI M, HEINRICH PC, MACKIEWICZ A, SCHNIERTSHAUER U, KLINGMÜLLER U (1999). Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. **Oncogene**, 18(25):3742-53.
- LACREUSETTE A, LARTIGUE A, NGUYEN JM, BARBIEUX I, PANDOLFINO MC.(2008). Relationship between responsiveness of cancer cells to Oncostatin M and/or IL-6 and survival of stage III melanoma patients treated with tumour-infiltrating lymphocytes. **J Pathol.**, 216(4):451-459.
- LEA IA, JACKSON MA, DUNNICK JK. (2009). Genetic pathways to colorectal cancer. **Mutat Res**, 670(1-2):96-98.
- LI F & LAI M. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. **Journal of Zhejiang University Science B**, 10 (3): 219-229.
- LI J, YANG L, GAUR S, ZHANG K, WU X *et al.* (2014). Mutants *TP53* p.R273H and p.R273C but not p.R273G enhance cancer cell malignancy. **Human Mutation**. Online.

- LIN YM, FURUKAWA Y, TSUNODA T, YUE CT, YANG KC *et al.* (2002). Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. **Oncogene**, 21(26):4120-4128.
- LIU H, ZHOU B, WANG L, LI Y, ZHOU ZG, SUN XF *et al.* (2007). Association of E1AF mRNA expression with tumor progression and matrilysin in human rectal cancer. **Oncology**, 73:384–388.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. **Methods**, 25, 402–408.
- LOSI L, RONCUCCI L, DI GREGORIO C, DE LEON MP, BENHATTAR J. (1996). *K-RAS* and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. **Journal of Pathology**, 178: 259-263.
- LOURENÇO GJ, CARDOSO-FILHO C, GONÇALES NSL, Y. SHINZATO JY, ZEFERINO LC, *et al.* (2006). A high risk of occurrence of sporadic breast cancer in individuals with the 104NN polymorphism of the COL18A1 gene. **Breast Cancer Res Treat**, 100: 335–338.
- LU B, ASARA JM, SANDA MG, ARREDOUANI MS. (2011). The Role of the Transcription Factor SIM2 in Prostate Cancer. **PLoS ONE**, 6(12): e28837.
- LU C, RAK JW, KOBAYASHI H, KERBEL RS. (1993). Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. **Cancer Res.**, 53(12):2708-11.
- LÜCHTENBORG M, WEIJENBERG MP, ROEMEN GMJM, BRUÏNE AP, van den BRANDT PA, *et al.* (2004). *APC* mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherlands Cohort Study. **Carcinogenesis**, 25 (7): 1219-1226.
- MARISA L, DE REYNIE`S A, DUVAL A, SELVES J, GAUB MP, *et al.* (2013) Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. **PLoS Med**, 10(5): e1001453
- MASSAGUÉ J. (2008). TGFbeta in Cancer. **Cell**, 134(2):215-30.
- MILANIZADEH S, KHANYAGHMA M, HAGHIGHI MM, MOHEBBI S, DAMAVAND B *et al.* (2013). Molecular analysis of imperative polymorphisms of MLH1 gene in sporadic colorectal cancer. **Cancer Biomarkers**, 13 (6): 427-432.

- MIYOSHI Y, ANDO H, NAGASE H, NISHISHO I, HORII A. (1992). Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. **Proc Natl Acad Sci**, 89: 4452-4456.
- MOJARAD EN, KUPPEN PJK, AGHDAEI HA, ZALI MR. (2013). The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench**, 6(3):120-128.
- MOSS AC, LAWLOR G, MURRAY D, TIGHE D, MADDEN SF *et al.* (2006). *ETV4* and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 345: 216–221.
- MUTO T, BUSSEY HJR, MORSON BC. (1975). The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36:2251-2270.
- NAGEL R, SAGE C, DIOSDADO B, WAAL M, VRIELINK JAFO, *et al.* (2008). Regulation of the Adenomatous Polyposis Coli Gene by the miR-135 Family in Colorectal Cancer. **Cancer Res**, 68(14): 5795-5802.
- NING Y, MANEGOLD PC, HONG YK, ZHANG W, POHL A, *et al.* (2011). Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. **Int. J. Cancer**, 128: 2038–2049.
- NOSHO K, IRAHARA N, SHIMA K, KURE S, KIRKNER GJ, *et al.* (2008). Comprehensive Biostatistical Analysis of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer Using a Large Population-Based Sample. **PLoS ONE**, 3(11): e3698.
- OGINO S, GOEL A. (2008). Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. **Journal of Molecular Diagnostics**, 10(1).
- OH S, SHIN S, JANKNECHT R. (2012). ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1826: 1–12.
- OLIVIER M, EELES R, HOLLSTEIN M, KHAN MA, HARRIS CC, HAINAUT P. (2002). The IARC *TP53* database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat**, 19:607–614.
- OLSCHWANG S, VERNEREY D, COTTET V, PARIENTE A, NALET B *et al.* (2009). Analysis of Candidate Genes in Occurrence and Growth of Colorectal Adenomas. **Journal of Oncology**, 2009: 1-9.
- ORSETTI B, SELVES J, BASCOUL-MOLLEVI C, LASORSA L, GORDIEN K *et al.* (2014). Impact of chromosomal instability on colorectal cancer progression and outcome. **BMC Cancer**, 14: (121) 1-26.

- PANCIONE M, REMO A, COLANTUONI V. (2012). Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer. **Progression Pathology Research International**. Article ID 509348.
- PARSONS MT, BUCHANAN DD, THOMPSON B, YOUNG JP, SPURDLE AB. (2012). Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: A literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. **J. Med. Genet.**, 49:151–157.
- PASPATIS GA, PAPANIKOLAOU N, ZOIS E, MICHALODIMITRAKIS E. (2001). Prevalence of polyps and diverticulosis of the large bowel in the Cretan population. An autopsy study. **Int J Colorectal Dis**, 16(4): 257-61.
- PELLECCHIA A, PESCUCCI C, LORENZO E DE, LUCERI C, PASSARO N *et al.* (2012). Overexpression of *ETV4* is oncogenic in prostate cells through promotion of both cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition. **Oncogenesis**, 1 – 11.
- PEREIRA ALA, VERAS SSL, SILVEIRA EJD, SEABRA FRG, PINTO LP, SOUZA LB, FREITAS RA, *et al.* (2005). The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. **Rev Bras Otorrinolaringol**, 71(1): 81-86.
- PINO MS, CHUNG DC. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. **Gastroenterology**, 138:2059–2072.
- POLISTENA A, CUCINA A, DINICOLA S, STENE C, CAVALLARO G *et al.* (2014). MMP7 expression in colorectal tumours of different stages. **In vivo**, 28: 105-110.
- R CORE TEAM: **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
- RINES RD, VAN ORSOUW NJ, SIGALAS I, LI FP, ENG C, *et al.* (1998). Comprehensive mutational scanning of the *p53* coding region by two-dimensional gene scanning. **Carcinogenesis**, 19 (6): 979–984.
- RENDEL E, MELLBERG S, DIMBERG A, PETERSSON L, BOTLING J, *et al.* (2007). Endocan is a VEGF-A and PI3K regulated gene with increased expression in human renal cancer. **Exp Cell Res**, 313(7):1285-94.
- RISIO M. (2010). Reprint of: The natural history of adenomas. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 24: 397–406.
- ROBERTSON DJ, GREENBERG ER, BEACH M, SANDLER RS, AHNEN D *et al.* (2005). Colorectal cancer in patients under close colonoscopic surveillance. **Gastroenterology**, 129:34–41.

- SARRAZIN S, ADAM E, LYON M, DEPONTIEU F, MOTTE V, et al. (2006). Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. **Biochim Biophys Acta.**, 1765(1):25-37.
- SHINYA H, WOLFF WI. (1979). Morphology, Anatomic Distribution and Cancer Potential of Colonic Polyps. **Annals of Surgery**, 190(6): 679-683.
- SHUANGSHOTI S. (2011). *KRAS* Mutation Testing in Advanced Colorectal Cancers. **The Bangkok Medical Journal**, p.63-67.
- SILLARS-HARDEBOL AH, CARVALHO B, ENGELAND M, FIJNEMAN RJA, MEIJER GA. (2012a). The adenoma hunt in colorectal cancer screening: defining the target. **J Pathol**, 226: 1–6.
- SILLARS-HARDEBOL AH, CARVALHO B, TIJSSEN M, JEROEN A M BELIËN JAM, WIT M, et al. (2012b). TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression. **Gut**, 61:1568–1575.
- SILLARS-HARDEBOL AH, CARVALHO B, WIT M, POSTMA C, DELIS-VAN DIEMEN PM, et al.. (2010). Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression. **Tumor Biol**, 31: 89–96.
- SIMI L, PRATESI N, VIGNOLI M, SESTINI R, CIANCHI F et al. (2008). High-Resolution Melting Analysis for Rapid Detection of *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* Gene Mutations in Colorectal Cancer. **Am J Clin Pathol**, 130:247-253.
- SITAR T, POPOWICZ GM, SIWANOWICZ I, HUBER R, HOLAK TA. (2006). Structural basis for the inhibition of insulin-like growth factors by insulin-like growth factor-binding proteins. **Proc Natl Acad Sci**, 29;103(35):13028-13033.
- SMYTH GK: Limma: linear models for microarray data. In: '**Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**'. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds), Springer, New York, 2005, p397-420.
- SNYDER M, HUANG XY, ZHANG JJ. (2011). Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) directly regulates cytokine-induced fascin expression and is required for breast cancer cell migration. **J Biol Chem.**, 286(45):38886-38893.
- SRIDHAR SS, GOODWIN PJ. (2009). Insulin–Insulin-Like Growth Factor Axis and Colon Cancer. **J Clin Oncol**, 27(2):165-167.

- SUBRAMANIANA A, TAMAYO P, MOOTHA VK, MUKHERJEE S, EBERTA BL, *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **PNAS**, 102(43): 15545–15550.
- TANAKA T, TANAKA M, TANAKA T, ISHIGAMORI R. (2010). Biomarkers for colorectal cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, 11:3209-3225.
- TANG H, GUO Q, ZHANG C, ZHU J, YANG H, *et al.* (2010). Identification of an intermediate signature that marks the initial phases of the colorectal adenoma-adenocarcinoma transition. **Int J Mol Med**, 26(5): 631-41.
- TANNAPFEL A, NEID M, AUST D, BARETTON G. (2010). The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. **Dtsch Arztebl Int**, 107 (43): 760–766.
- THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, 487:330-337.
- THEODORATOU E, CAMPBELL H, TENESA A, MCNEILL G, CETNARSKYJ R, *et al.* (2008). Modification of the associations between lifestyle, dietary factors and colorectal cancer risk by *APC* variants. **Carcinogenesis**, 29(9): 1774–1780.
- THOMAS DC, UMAR A, KUNKEL TA. (1996). Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer. **Mutat. Res.**, 350:201–205.
- VASEN HF, ABDIRAHMAN M, BROHET R, LANGERS AM, KLEIBEUKER JH *et al.* (2010). One- to two-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. **Gastroenterology**, 138:2300–2306.
- VEDELD HM, SKOTHEIM RI, LOTHE RA, LIND GE. (2014). The recently suggested intestinal cancer stem cell marker *DCLK1* is an epigenetic biomarker for colorectal cancer. **Epigenetics**, 9: (3) 346–350.
- VELCICH A, YANG W, HEYER J, FRAGALE A, NICHOLAS C *et al.* (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin *Muc2*. **Science**, 295(5560):1726-1729.
- VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE AJ. (2000). Surfing the p53 network. **Nature**, 408:307–310.
- VOORHAM QJM, CARVALHO B, SPIERTZ AJ, CLAES B, MONGERA S, *et al.* (2012). Comprehensive Mutation Analysis in Colorectal Flat Adenomas. **PLoS ONE**, 7(7): e41963.

- VYMETALKOVA VP, SLYSKOVA J, KORENKOVA V, BIELIK L, LANGEROVA L *et al.* (2014). Molecular characteristics of mismatch repair genes in sporadic colorectal tumors in Czech patients. **BMC Medical Genetics**, 15:(17) 1-9.
- WALDNER MJ, FOERSCH S, NEURATH MF. (2012). Interleukin-6 – a key regulator of colorectal cancer development. **International Journal of Biological Sciences**, 8(9):1248-1253.
- WANG M-L, PAN C-M, CHIOU S-H, CHEN W-H, CHANG H-Y, *et al.* (2012). Oncostatin M modulates the mesenchymal–epithelial transition of lung adenocarcinoma cells by a mesenchymal stem cell-mediated paracrine effect. **Cancer Res**, 72(22); 6051–64.
- WAUGH DJJ, WILSON C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. **Clin Cancer Res**, 14:6735-6741.
- WEI GH, BADIS G, BERGER MF, KIVIOJA T, PALIN K *et al.* (2010). Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. **The EMBO Journal**, 29: 2147–2160.
- WEISS TW, SIMAK R, KAUN C, REGA G, PFLÜGER H *et al* (2011). Oncostatin M and IL-6 induce u-PA and VEGF in prostate cancer cells and correlate in vivo. **Anticancer Res.**, 31(10):3273-3278.
- WINAWER SJ, ZAUBER AG, O'BRIEN MJ, HO MN, GOTTLIEB L, *et al.* (1993). Randomized Comparison of Surveillance Intervals after Colonoscopic Removal of Newly Diagnosed Adenomatous Polyps. **N Engl J Med**, 328:901-906.
- www.gastrolab.net/show.htm
- YEE D, LEE AV. (2000). Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, 5:107–115.
- YUAN P, SUN MH, ZHANG JS, ZHU XZ, SHI DR. (2001). APC and K-RAS gene mutation in aberrant crypt foci of human colon. **World J. Gastroenterol.**, 7(3): 352-356.
- YUEN HF, MCCRUDDEN CM, CHAN KK, CHAN YP, WONG ML *et al.* (2011). The role of Pea3 group transcription factors in esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Pathol**, 179(2):992-1003.
- ZHANG Y, LAI M, LV B, GU X, WANG H *et al.* (2003). Overexpression of Reg IV in colorectal adenoma. **Cancer Lett.**, 200(1):69-76.

ZHENG L, WENG M, QI M, QI T, TONG L, *et al.* (2012). Aberrant expression of intelectin-1 in gastric cancer: its relationship with clinicopathological features and prognosis. **J Cancer Res Clin Oncol.**, 138(1):163-172.

ZHENG LD, TONG QS, WENG MX, HE J, LV Q *et al.* (2008). Enhanced expression of resistin-like molecule beta in human colon cancer and its clinical significance. **Dig Dis Sci.**, 54(2):274-81.

Anexo 1

Ribeirão Preto, 09 de dezembro de 2010

Ofício nº 4142/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "ASSINATURA GÊNICA E DE microRNAs (miRNAs) ENTRE ADENOMA E ADENOCARCINOMA COLORRETAL" foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 316ª Reunião Ordinária realizada em 06/12/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12636/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

ALINE SIMONETI FONSECA

PROF. DR. WILSON ARAÚJO DA SILVA JUNIOR (Orientador)

Depto. de Genética – FMRP-USP

Anexo 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Realização de Teste Genético

Título do Projeto: Assinatura de mRNA entre adenoma e adenocarcinoma colorretal

1. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Este projeto pretende identificar marcadores genéticos (características genéticas que poderiam diferenciar portadores de câncer colorretal de não portadores) com potencial diagnóstico e prognóstico, aplicados à pacientes portadores de câncer colorretal. As amostras para esse projeto serão procedentes de pacientes atendidos no serviço de Proctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para participar da pesquisa, o paciente deverá autorizar a utilização de um fragmento do material de biópsia coletado durante a colonoscopia, além da retirada de 10 ml de sangue por punção de uma veia do braço. O local da punção poderá apresentar leve dor ou inchaço que regredem espontaneamente. No laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, tanto o sangue quanto o fragmento de biópsia serão utilizados para extração de DNA e RNA e posterior busca dos potenciais marcadores genéticos. O material ficará estocado em freezer por tempo indeterminado e não será disponibilizado para outras pesquisas sem sua prévia autorização.

A identidade do paciente e as informações obtidas durante a pesquisa serão confidenciais e somente membros da equipe terão acesso durante o processo, entretanto, o paciente não é obrigado a continuar participando do projeto e pode a qualquer momento pedir para que os seus dados não façam parte da pesquisa, sem que deixe de ser tratado como os demais pacientes assistidos na instituição. Também poderá requisitar, particularmente, seus dados, os dados referentes à análise do seu DNA e orientação adicional, fornecidas pelo pesquisador. Não haverá qualquer custo pela participando neste trabalho, portanto, não haverá nenhuma forma de pagamento pela participação.

O paciente receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Pesquisador(a) responsável: Msc. Aline Simoneti Fonseca

Telefone para contato: (16) 2101-9368

Endereço: Rua Tenente Catão Roxo, nº 2501. CEP 14051-140 - Bairro: Monte Alegre Ribeirão Preto-SP

Anexo 3

2. CONSENTIMENTO LIVRE E PÓS-INFORMADO

Declaro que fui esclarecido:

- Sobre a importância da Identificação de marcadores genéticos de diagnóstico e prognóstico aplicados ao Carcinoma Colorretal;
- Sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios e as limitações do teste genético ao qual serei submetido;
- Sobre a minha liberdade em retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao acompanhamento médico e continuidade do meu tratamento;
- Sobre o não recebimento de nenhum tipo de remuneração financeira;
- Sobre a segurança de que minha identidade será preservada, que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais e que o meu material biológico doado (sangue e amostra de biópsia) armazenado no hospital será utilizado apenas para este projeto;

Assim, concordo em participar deste estudo.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente: _____

Local de Nascimento: _____

Data de nascimento: __/__/__

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Fone: _____

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Tabela 1: Localização e anátomo-patológico dos tecidos de cada paciente.

Paciente	Sexo	Idade	Cor	Adenoma	Região	Adenocarcinoma	Região	Grau*
1	M	77	branco	Tubular com displasia leve	sigmóide	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	sigmóide	T1N0
2	F	88	branca	Túbulo-viloso com displasia leve	reto	Tubular invasivo pouco diferenciado	reto	T2N2
3	F	69	mulata	Tubular com displasia leve	retossigmóide	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	retossigmóide	T3N1
4	M	87	branco	Tubular com displasia leve	sigmóide	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	sigmóide	T3N0
5	F	72	branca	Tubular com displasia moderada	ascendente	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	ascendente	T3N1
6	M	66	branco	Tubular com displasia moderada	reto baixo	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	reto alto	-----
7	F	35	mulata	Tubular com displasia moderada	sigmóide	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	sigmóide	T3N1
8	F	78	branca	Tubular com displasia leve	reto alto	Tubular invasivo bem diferenciado	reto alto	T3N0
9	M	67	branco	Tubular com displasia leve	transverso	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	transverso	T3N0
10	M	75	mulato	Tubular com displasia de baixo e alto grau	reto-sigmóide	Tubular invasivo moderadamente diferenciado	reto-sigmóide	T3N2

*Classificação de Tumores Malignos TNM (INCA, 2004).

T - Tumor Primário

T1 Tumor que invade a submucosa

T2 Tumor que invade a muscular própria

T3 Tumor que invade além da muscular própria alcançando a subserosa ou os tecidos peri-cólicos ou peri-retais, não peritonizados

N- Linfonodos Regionais

N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1 Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais

N2 Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais

Tabela 2: Exon, sequência, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para os genes *APC*

Gene <i>APC</i> éxons	Sequência 5' - 3'	Fragmento (pb)	T°C anelamento
1	F:AAGCAGCCACTAAATTTTT R:TTTACAAGAGGGAATACTGAAT	271	*
2	F:AAGAAATACAGAATCATGTC R:GTACTTGGATCTACACACC	229	58
3	F:CATTAAGAATATTTTAGACTGCT R:AACAATAAACTGGAGTACACA	319	*
4	F:CAACTGATGTAAGTATTGCTC R:TAATGGATTACCTAGGTACT	262	56
5	F:TTTATTGGTTCTTATATGCT R:CCTAATAGCTCTTCGCTG	245	54
6	F:TGAGCTTTTAAGTGGTAG R:TTCTCAGAATAACTACCTA	229	*
7	F:CTTGGGCTAAGAAAGCCT R:CTTAGAACCATCTTGCTTC	239	62
8	F:CATGATGTTATCTGTATTTACC R:CTTAGCAAAGTAGTCATGGC	215	59
9	F:GGATATTAAAGTCGTAATTTTGT R:CATGCACTACGATGTACACT	458	*
10	F:CATCATTGCTCTTCAAATAACA R:CACCAGTAATTGTCTATGTCA	195	*
11	F:TAGATGATTGTCTTTTCCTCT R:TCATACCTGAGCTATCTTAAG	223	56
12	F:GCTTGGCTTCAAGTTGTCTT R:CAGAGTGAGACCCTGCCT	195	62
13	F:GCAACTAGTATGATTTTATGTATAAA R:ACATGAAATTCATATTATAGTACT	285	*
14	F:CAACTCTAATTAGATGACCCA R:GAGAGTATGAATTCTGTACTT	303	*
15.1	F:CAATCATATTATGCCTTTTGTC R:GATGGCAAGCTTGAGCCAG	389	64
15.2	F:CGAAGTACAAGGATGCCAAT R:CAGTGGTGGAGATCTGCAA	447	60
15.3	F:AACTACCATCCAGCAACAGA R:TCTAGTTCTCCATCATTATCAT	482	58
15.4	F:TCAATACCCAGCCGACCT R:GGCTTATCATCTTCATAGTCA	426	58
15.5	F:GTAAGCCAGTCTTTGTGTC R:CAGCTGATGACAAAGATGAT	478	62
15.6	F:AGACTTATTGTGTAGAAGATAC R:ATGGTTCACTCTGAACGGA	450	58
15.7	F:TCTGTCACTTCACTTGATAG R:CATTGATTCTTTAGGCTGC	475	58
15.8	F:ACAGAAAGATGTGGAATTAAG R:TTCTCCAGCAGCTAACTCAT	472	58
15.9	F:GCTACATCTCTAAGTGATCT R:CTTATCATTGAAGACCTTGG	519	58
15.10	F:CTCAGACAACAAAGATTCAAA R:GAGAAAAGCAAACCGGAGTA	479	56
15.11	F:AGTCATCCAAAGACATACCA R:CTGAATCAGGGGATAGACC	486	56
15.12	F:GATATACAGAGACCAGATTCA R:ACAGGACTTGTAAGTTGAGGA	494	61
15.13	F:CGAGGCAGGACAATGATTC R:GACTCACTTCTTGAATACTA	512	61
15.14	F:CAGATGAGCCAACAGAACC R:GCTGGTCTAGATGATGGAG	302	60
15.15	F:TGGAGGAATCTGCTTCATTT R:TCCTTTTGCGGATACTTGG	464	60
15.16	F:TGAAGTCTATTTAGGAACC R:GTACGTTCCACTATAGAAGT	505	60
15.17	F:TGTCCCTGTATCAGAGACT R:TGTCTATATAGCAGTTGTAATT	356	58

Tabela 3: Exon, sequência, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para os genes *TP53* e *K-RAS*.

Gene <i>TP53</i> éxons	Sequência 5' - 3'	Fragmento (pb)	T°C anelamento
2	F:CCCCACTTTTCCTCTTGC R:CCTGCCCTTCCAATGGAT	148	61
3	F:TGGGACTGACTTTCTGCT R:GCCCAACCCTTGTCTTA	71	62
4.1	F:GCTCTTTTCACCCATCTACAG R:CAGACGGAAACCGTAGC	258	56
4.2	F:CCAGCAGCTCCTACACC RGCATTGAAGTCTCATGGAAG	189	61
5.1	F:GCCCTGACTTTCAACTCTGTCT R:CACAACCTCCGTCATGTG	183	61
5.2	F:TGCCCTCAACAAGATGTTT R:CAACCAGCCCTGTCGTCT	214	61
6	F:CCTCACTGATTGCTCTTAG R:CCAGTTGCAAACCAGAC	149	56
7	F:TGGGCCTGTGTTATCTCCTA R:ATAGATTGGCAAGTGGCTCCTGA	155	66
8	F:TGCCTCTTGCTTCTCTTTTC R:CTCCACCGCTTCTTGTC	199	56
9	F:ATCACCTTTCCTTGCCTCTTT R:CTGGAACTTTCCACTTGAT	142	56
10	F:TCTCCCCCTCCTCTGTTG R:ATCCTATGGCTTTCCAACCT	196	59
11	F:CCTGCTTCTGTCTCCTAC R:TCAGTGGGGAACAAGAAG	129	56
Gene <i>K-RAS</i> éxon	Sequência 5' - 3'	Fragmento (pb)	T°C anelamento
2	F:GGCCTGCTGAAAATGACTGAAT R:TCAAAGAATGGTCCTGCACC	172	67

Figura 1: Variantes do éxon 4 do gene *TP53* pela técnica de HRM. Verde: controle (sem alteração) e amostras sem mutação; vermelhos: variante 2; Azuis: variante 3.

A técnica HRM tem a capacidade de separar amostras de DNA controle (p.e. uma região gênica sem alteração) de outra com mutação através da curva de dissociação. Uma única base alterada modifica a temperatura de dissociação da dupla fita de DNA criando padrões de curvas diferenciados, como os observados na Figura 1. A variante 1 na cor verde representa as

amostras sem mutação, visto que os controles previamente sequenciados e sem mutações estavam neste grupo. A variante 2 na cor vermelha e a variante 3 na cor azul foram as duas mutações observadas no éxon 4 do gene *TP53* (R72P e P36P). Apesar de distinguir variantes de uma mesma região gênica, o método HRM não é capaz de fornecer o tipo de alteração encontrada e por isso é necessário o sequenciamento da amostra.

Tabela 4: Genes em quatro regiões cromossômicas diferentes. Os genes em *itálico* estão hiperexpressos e genes em **negrito** estão hipoexpressos.

20q13 (p=3,31e-7)	20q11 (p=5,34e-4)	4p21 (p=4,2e-3)	4p14 (p=2,47e-3)
<i>AURKA</i>	<i>AHCY</i>	<i>CXCL10</i>	ATP8A1
BCAS1	<i>CPNE1</i>	<i>CXCL11</i>	C4orf19
<i>C20orf11</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>CXCL9</i>	C4orf34
<i>C20orf111</i>	<i>E2F1</i>	<i>EREG</i>	NSUN7
<i>C20orf177</i>	<i>FAM83D</i>	IGJ	
<i>C20orf20</i>	<i>PDRG1</i>	RASSF6	
<i>CEBPB</i>	<i>PROCR</i>	SLC4A4	
<i>CSE1L</i>	<i>RBL1</i>		
<i>DIDO1</i>	<i>TGIF2</i>		
<i>DPM1</i>	<i>TPX2</i>		
<i>MYBL2</i>			
<i>PFDN4</i>			
<i>SALL4</i>			
<i>SLC04A1</i>			
<i>TFAP2C</i>			
<i>TP53RK</i>			
<i>UBE2C</i>			
<i>YTHDF1</i>			

Tabela 5: Enriquecimento das vias de sinalização.

Vias de sinalização	Genes	FC*	p valor
Cell adhesion_ECM remodeling	COL1A1	2,754	0,001817
	COL3A1	1,587	0,01629
	COL4A3	-1,593	0,031976
	IL8	2,945	0,028296
	KLK1	-3,564	0,014367
	KLK3	-3,116	0,006334
	SPARC	1,627	0,004202
	PLAU	1,068	0,040273
	SDC2	1,027	0,026623
	VCAN	1,125	0,022739
Protein folding and maturation_Angiotensin system maturation \ Human version	AGT	-1,237	0,01257
	KLK1	-3,564	0,014367
Protein folding and maturation_Angiotensin system maturation \ Rodent version	AGT	-1,237	0,01257
	KLK1	-3,564	0,014367
Development_Transcription factors in segregation of hepatocytic lineage	INHBA	5,534418	0,005941
	SERPINA1	-3,7832	0,02241
	FGFR2	-1,459	0,003137
	p14ARF	1,792	0,023661
	P16INK4	1,792	0,027365
	TBX3	-1,454	0,031076
Cell adhesion_Cell-matrix glycoconjugates	ACAN	2,130	0,001079
	ELN	2,226	0,000722
	FBLN2	1,681	0,037579
	LGALS4	-1,101	0,009344
	TCN	1,518	0,014367
	VCAN	1,125	0,022739
	CSPG4	1,107	0,011173
Expression targets of Tissue factor signaling in cancer	CTGF	1,175	0,019759
	CYR61	2,412	0,011668
	IL8	2,945	0,028296
	PLAU	1,068	0,040273
	VEGFC	1,096	0,031326
Development_Regulation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)	BCL2	-1,259	0,002435
	CALD1	1,066	0,0159
	CLDN1	1,602	0,002247
	EDNRA	1,319	0,022562

	OSM	2,874	0,009139
	PDGFRB	1,559	0,007177
	TGFB2	1,317	0,003882
	WNT	2,653	0,006011
<hr/>			
Upregulation of MITF in melanoma	BCL2	-1,259	0,002435
	CKIT	-1,459	0,001674
	E2F1	1,358	0,00119
	P16INK4	1,792	0,023661
	PDE4D	-1,060	0,012933
	VEGFA	1,206	0,001231
<hr/>			
KRAS signaling in pancreatic cancer	BCL2	-1,259	0,002435
	CMYC	1,089	0,037449
	GLUT1	1,270	0,007081
	IL8	2,945	0,028296
	PLAU	1,068	0,040273
	VEGFA	1,206	0,001231
<hr/>			
IGF family signaling in colorectal cancer	CLU	-1,467	0,006284
	E2F1	1,358	0,00119
	IBP	1,306	0,002346
	IBP3	1,306	0,002444
	IL8	2,945	0,028296
	IRS1	1,052	0,043367
	VEGFA	1,206	0,001231

Figura 2. Legenda MetaCore