

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Mário Vinícius Angelete Alvarez Bernardes

**Expressão de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 e
correlações clínico-patológica e prognóstica em pacientes
com câncer esporádico de cólon**

**Ribeirão Preto
- 2017 -**

Mário Vinícius Angelete Alvarez Bernardes

**Expressão de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 e
correlações clínico-patológica e prognóstica em pacientes
com câncer esporádico de cólon**

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do **Título de Doutor** em Ciências.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Omar Féres

Ribeirão Preto

- 2017 -

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

Bernardes, Mário Vinícius Angelete Alvarez

Expressão de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 e correlações clínico-patológica e prognóstica em pacientes com câncer esporádico de cólon. Ribeirão Preto, 2017.

89 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica cirúrgica.

Orientador: Féres, Omar.

1. Neoplasias do sistema digestório. 2. Neoplasias do cólon.
3. Sobrevida. 4. Prognóstico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bernardes, Mário Vinícius Angelete Alvarez

Expressão de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 e correlações clínico-patológica e prognóstica em pacientes com câncer esporádico de cólon

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do **Título de Doutor** em Ciências
Área de concentração: Clínica cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Omar Féres

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial à minha mãe, que investiu tudo o que tinha de mais precioso para fornecer uma educação de excelente qualidade para o meu irmão e para mim.

Dedico ainda aos pacientes oncológicos e seus familiares, que Deus possa dar força a todos nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por até aqui ter nos conduzido com vida e saúde.

Agradeço também:

à minha mãe, Sineid, que com seu jeito doce e amoroso conseguiu me mostrar a importância de estudar.

ao meu pai, José Roberto, pelo exemplo de retidão, seriedade e compromisso com a família.

à Branca, que com seu carinho e companheirismo desde os tempos de namoro me tornou uma pessoa melhor, sempre me motivando e me apoiando com seu amor incondicional.

à Helena, que me mostrou que o amor não tem limites...te amo muito filha!!

ao meu irmão, Paulo, meu melhor amigo e conselheiro, por dividir comigo todos os ensinamentos que a vida arduamente oferece.

ao Padrinho Sinval e à Madrinha Alceney, por me ensinarem os dons do perdão e do acolhimento.

à vovó Terezinha, sempre querida, que cuidou de mim com todo o amor e carinho, e que ainda cuida através de suas orações.

à tia Bete, ao Tio Deco, ao Mário Broetto, ao Pignaton, ao Almir, ao Cesário, ao Dal'Col e ao Edu, que me acolheram e me ampararam quando eu mais precisei.

à D. Angélica, ao Sr. Geoffrey, à Camila, à Carol e ao João, que me ajudaram e incentivaram.

ao saudoso Professor Roberto Gomes, que foi como um pai para mim dentro da Medicina...que Deus o proteja onde estiver Professor!!

ao Prof. Dr. José Joaquim Ribeiro da Rocha, por me ensinar que menos pode ser mais, em oncologia e na vida, e por me receber com tanta disponibilidade na Divisão de Coloproctologia.

ao Prof. Dr. Omar Féres, meu orientador, pela amizade, pelos conselhos e por acreditar em mim e ter me dado condições de desenvolver esse projeto no tempo programado.

ao Dr. Marley Ribeiro Feitosa, pela parceria no doutorado e nas publicações e pelo exemplo de dedicação ao ensino de alunos e residentes.

à Marlene Lúcio, que me recebeu de braços abertos mesmo não me conhecendo e se tornou uma grande amiga, sempre carinhosa e disposta a ajudar em tudo.

à Lauceia e à Maria Cristina, pelo suporte que me deram na redação, formatação e revisão bibliográfica da tese.

ao querido amigo Niltão, sem dúvida o maior exemplo de superação que tive a graça de conhecer pessoalmente.

ao Sr. Nelson, pelo exemplo de simplicidade e de humildade.

Agradeço ainda a todos aqueles que me ajudaram e me incentivaram, desde os primeiros passos no ICE, em Cachoeiro de Itapemirim, e posteriormente no CELV, em Vitória, durante o 3º ano do ensino médio que culminou com meu ingresso na faculdade.

Deixo também meu agradecimento a todos os parceiros de caminhada que dividiram comigo experiências e aprendizados no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo onde cursei minha graduação em Medicina, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ao longo da residência de Cirurgia Geral e no Hospital Erasto Gaertner durante a residência em Cancerologia Cirúrgica na bela capital paranaense.

à equipe do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Prof. Dra. Daniela e ao Fermino Neto, sem o qual a fase de experimentos dessa tese não teria sido possível.

a todos os colaboradores, médicos residentes, médicos assistentes e docentes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que fizeram parte dessa vitória.

à Divisão de Coloproctologia, o meu sincero e carinhoso muito obrigado a todos!!

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants”

Isaac Newton

RESUMO

BERNARDES, M. V. A. A. **Expressão de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 e correlações clínico-patológica e prognóstica em pacientes com câncer esporádico de cólon.** 2017. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

Introdução e Justificativa: O câncer colorretal é a 3^a neoplasia maligna mais incidente no mundo, e apresenta comportamento bastante heterogêneo aos tratamentos instituídos. Conseguir diferenciar os pacientes de acordo com seu prognóstico e comportamento tumoral é um desafio. A biologia molecular, através dos microRNA (miRNA), pode contribuir na identificação do perfil tumoral e ajudar a prever os desfechos clínicos. **Objetivos:** Comparar a expressão tecidual de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 de pacientes com câncer de cólon, correlacionando o perfil de expressão de miRNA com aspectos clinicopatológico e prognóstico. **Casuística e Métodos:** Quantificação de miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 pela técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) em amostras de tecido tumoral em pacientes com câncer esporádico de cólon (grupo de estudo) operados entre janeiro de 2010 a dezembro de 2011 e em amostras de tecido colônico sadio de pacientes saudáveis (grupo controle) submetidos à colonoscopia de rotina para rastreamento de câncer colorretal. Os resultados das dosagens de miRNA foram correlacionados ao valor do antígeno carcinoembrionário (CEA), idade, estadiamento, invasão linfovascular, sobrevida livre de doença e sobrevida global. **Resultados:** A idade média dos pacientes foi de 66 anos e 60% eram do sexo masculino. No momento do diagnóstico inicial 22% apresentavam metástase à distância, e em 80% dos pacientes foi atingida ressecção R0. A sobrevida global foi de 46 meses e a sobrevida livre de doença foi de 32 meses. Apenas o miRNA-133a esteve hipoexpresso no grupo de estudo ($p=0,0007$). Ao se correlacionar os perfis de expressão dos miRNA às variáveis clínico-patológica e prognóstica, a hiperexpressão do miRNA-92a esteve associada a maior sobrevida global ($p= 0,044$). **Discussão:** O tempo de espera entre o encaminhamento para hospitais terciários e o início do tratamento oncológico pode contribuir para o elevado índice de pacientes com doença metastática ao diagnóstico. Melhores desfechos têm sido associados a hospitais de maior volume, aparentemente devido à maior expertise de que esses hospitais possuem. O miRNA-133a, um supressor tumoral, tem sido hipoexpresso em amostras tumorais quando comparadas a tecidos sadios. Por sua vez, a hiperexpressão do promotor tumoral miRNA-92a que esteve associada a melhor prognóstico, pode ser explicada por uma desregulação dos genes alvo desse miRNA ou por diferenças geográficas na expressão dos miRNA. **Conclusão:** o miRNA-133a encontra-se hipoexpresso em amostras tumorais, enquanto que a hiperexpressão do miRNA-92a esteve associada a melhor sobrevida global.

Palavras-chave: Neoplasias do sistema digestório. Neoplasias do cólon. Sobrevida. Prognóstico. MicroRNA.

ABSTRACT

BERNARDES, M. V. A. A. **Correlation of miRNA- 92a, miRNA-133a and miRNA-145 expression profile with clinicopathological variables and oncological outcomes on non-hereditary colon cancer.** 2017. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

Introduction: Colorectal cancer is the 3rd most common malignancy in the world, and their incidence has been increase in the last decades. Although patients diagnosed with early stage tumors have more than 65% of overall survival, behavior of colorectal tumors and their response to established treatments is quite heterogeneous. **Gap:** In this context, becomes interesting differentiate patients according to their prognosis and tumor behavior. Molecular biology through the miRNA quantification can improve the identification of tumor profile and predict clinical outcomes. **Propose:** Evaluate tumor profile tissue expression of miRNA- 92a, miRNA- 133a and miRNA-145 in patients with non-hereditary colon cancer, correlating with clinicopathological variables and oncological outcomes. Assessing the ability of the expression of these miRNA predict the prognosis. **Methods:** A dosage of miRNA-92a, miRNA-133a and miRNA-145 was performed in tumor tissue samples from patients with colon cancer (called study group) and non-tumoral colonic tissue samples from healthy patients (called the control group) by real-time polymerase chain reaction. The results of miRNA levels were correlated with clinicopathological data and oncological outcomes. **Results:** Mean age was 66 years and 60% was male. At initial diagnosis, 22% of lesions had distant metastasis. R0 resection was achieved in 80% of patients. Disease-free survival was 32 months, and overall survival was 46 months. The MiRNA-133a showed higher values in the control group when compared to the study group ($p = 0.0007$), and miRNA-92a was associated with higher overall survival ($p = 0.044$). **Discussion:** Better outcomes in highly specialized centers could be explained by advances in surgical technique and perioperative care. MiRNA-133a was underexpressed in colonic tumoral tissue, likely others tumors. MiRNA-92a overexpression was associated with improve overall survival. It could be explained through deregulation of target genes or geographic patterns of miRNA expression. **Conclusion:** MiRNA-133a was underexpressed in study group, and over expression of miRNA-92a was associated with better overall survival.

Keywords: Colonic Neoplasms. Survival. Prognosis. MicroRNA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de Dukes modificada por Astler-Coller	18
Tabela 2 - Estadiamento TNM, 7ª edição	19
Tabela 3 - Agrupamento por estadios, TNM, 7ª edição	20
Tabela 4 - Dados clínicos do grupo de estudo	40
Tabela 5 - Fatores histológicos e desfechos oncológicos do grupo de estudo	41
Tabela 6 - Análise univariada para risco de recorrência tumoral ou morte por câncer	43
Tabela 7 - Expressão de miRNA-92a e valor de CEA ao diagnóstico	45
Tabela 8 - Expressão de miRNA-92a e idade ao diagnóstico	46
Tabela 9 - Expressão de miRNA-92a e estadiamento	46
Tabela 10 - Expressão de miRNA-92a e invasão linfovascular	46
Tabela 11 - expressão de miRNA-92a e sobrevida livre de doença	47
Tabela 12 - Expressão de miRNA-92a e sobrevida global	47
Tabela 13 - Expressão de miRNA-133a e dosagem de CEA	48
Tabela 14 - Expressão de miRNA-133a e idade	48
Tabela 15 - Expressão de miRNA-133a e estadiamento	48
Tabela 16 - Expressão de miRNA-133a e invasão linfovascular	49
Tabela 17 - Expressão de miRNA-133a e sobrevida livre de doença	49
Tabela 18 - Expressão de miRNA-133a e sobrevida global	50
Tabela 19 - Expressão de miRNA-145 e dosagem de CEA	50
Tabela 20 - Expressão de miRNA-145 e idade	50
Tabela 21 - Expressão de miRNA-145 e estadiamento	51
Tabela 22 - Expressão de miRNA-145 e invasão linfovascular	51
Tabela 23 - Expressão de miRNA-145 e sobrevida livre de doença	52
Tabela 24 - Expressão de miRNA-145 e sobrevida global	52

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sobrevida livre de doença de acordo com o subtipo molecular em pacientes com CCR estadio clínico III. (modificado a partir de SINICROPE et al., 2016).....	23
Figura 2 - Seis alterações celulares associadas à tumorigênese propostas inicialmente (Modificado a partir de HANAHAN; WEINBERG, 2000).....	25
Figura 3 - Quatro alterações celulares adicionais associadas à tumorigênese (Modificado a partir de HANAHAN; WEINBERG, 2011).....	26
Figura 4 - Teoria adenoma-adenocarcinoma proposta para tumores colorretais (modificado a partir de FEARON; VOGELSTEIN, 1990).....	28
Figura 5 - Desenho esquemático da participação de células tronco-tumorais no surgimento de tumores colorretais (modificado a partir de SOTTORIVA et al., 2015).....	30
Figura 6 - Desenho esquemático da teoria do big bang no surgimento de tumores colorretais (modificado a partir de AMARO et al., 2016).....	31
Figura 7 - Processo de síntese e nível de atuação de miRNA (modificado a partir de YAN et al., 2015).....	32
Figura 8 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global por estadios.....	42
Figura 9 - Fold de dosagem de miRNA-92a nos pacientes do grupo controle e do grupo de estudo	44
Figura 10 - Fold de dosagem de miRNA-133a nos pacientes do grupo controle e do grupo de estudo	44
Figura 11 - Fold de dosagem de miRNA-145 nos pacientes do grupo controle e do grupo de estudo	45

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

miRNA:	microRNA
RT-PCR:	reação em cadeia de polimerase em tempo real
CEA:	antígeno cárcinoembrionário
R0:	margens micro e macroscópica livres de tumor
R1:	margem macroscópica livre de tumor mas margem microscópica acometida por neoplasia
R2:	persistência de doença residual macroscópica
SIH/SUS:	Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
UICC:	<i>Union for International Cancer Control</i>
TNM:	sistema de estadiamento proposto pela <i>Union for International da Cancer Control</i>
KRAS:	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
MMR:	proteínas de reparo do DNA
HCFMRP-USP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
CCR:	câncer colorretal
MSI:	instabilidade de microssatélites
MSI-H:	elevada instabilidade de microssatélite
MSI-L:	baixa instabilidade de microssatélites
MSS:	estabilidade de microssatélites
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
TCLE:	termo de consentimento livre e esclarecido
SLD:	sobrevida livre de doença
SG:	sobrevida global
ILV:	invasão linfovascular

SAME:	Serviço de Arquivo Médico
Ct:	<i>threshold cycle</i>
PBS:	<i>phosphate-buffered saline</i>
DEPC:	dimetil pirocarbonato
cDNA:	DNA complementar
ASA:	Sistema de Classificação de comorbidades da <i>American Society of Anesthesiologists</i>
RNAm:	RNA mensageiro
ABCB5:	<i>ATP-binding cassette member 5 gene</i>
EC:	estadiamento clínico
PTEN:	<i>phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10</i>
PIK3:	via da quinase fosfatidilinositol 3
AKT:	via da proteinoquinase B
VEGF:	fator de crescimento derivado do endotélio
HIF-1:	fator induzido pela hipóxia
EGFR:	receptor do fator de crescimento derivado do endotélio
ZEB 1:	<i>zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
ZEB 2:	<i>zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>
TGFβ:	fator de crescimento transformador beta
EMT:	transição epitélio-mesenquimal
SEN1:	<i>small ubiquitin-like modifier-specific protease 1</i>
NSCLC:	tumor de pulmão não-pequenas células

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos históricos	16
1.2 Epidemiologia	16
1.3 Estadiamento	18
1.4 Fatores prognósticos	20
1.5 Diferenças entre tumores de cólon e reto.....	23
1.6 Tumorigênese	24
1.7 Implicação de microRNA no câncer de cólon.....	31
2 OBJETIVOS	34
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
3.1 Classificação do tipo de pesquisa, desenho geral do estudo e casuística	35
3.2 Coleta de amostras do grupo controle	36
3.3 Coleta de amostras do grupo de estudo	36
3.4 Coleta de dados clínicos	36
3.5 Detalhamento técnico da dosagem de miRNA.....	37
3.6 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	53
5.1 Casuística.....	54
5.2 miRNA e correlações clínico-patológica e prognóstica	57
5.2.1 miRNA-92a.....	62
5.2.2 miRNA-133a.....	63
5.2.3 miRNA-145.....	65
5.3 Considerações finais	67
6 CONCLUSÃO	69
7 REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos

Sob o ponto de vista histórico, o primeiro caso compatível de tumor maligno foi descrito em 2625 a.C., quando o médico egípcio Imhotep relatou o caso de uma paciente com tumor de mama localmente avançado (THE EDWIN SMITH..., 2016).

A palavra câncer, entretanto, apenas passou a ser utilizada para se referir à neoplasia por volta de 400 a.C. Naquela ocasião, Hipócrates associou as patas de um caranguejo enterrado na areia e abertas em círculo ao edema e hipervascularização adjacentes ao tumor (SINGERIST, 1932; TOBEY, 1932).

Quando avaliado sob ótica cultural, entretanto, a palavra câncer tem sido associada à ausência de possibilidades de tratamento e à experiência de sensações de angústia, desespero e sofrimento. Dessa maneira, o termo câncer engloba sob um mesmo nome neoplasias malignas de comportamentos e etiologias distintas (MUKHERJEE, 2012).

1.2 Epidemiologia

Segundo estimativa mundial, o câncer colorretal (CCR) configura a 3^a neoplasia maligna mais comum no mundo e a 4^a em número de óbitos. Em 2008 foram diagnosticados mais de 1,2 milhão de novos casos de CCR, e um total de 608.700 mortes foram computadas pela neoplasia (AHMED et al., 2014; PEERY et al., 2012).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados 32.600 novos casos de tumores de cólon e reto para o ano de 2014, havendo discreta predominância entre as mulheres (BRASIL, 2014; OLIVEIRA MIRANDA et al., 2014).

Apesar do custo total associado ao tratamento de pacientes com CCR no país não poder ser calculado com exatidão, devido à inexistência de um banco de dados nacional, algumas estimativas são possíveis.

Através do levantamento de dados do Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) – Ministério da saúde, pode-se estimar que o custo hospitalar do tratamento das neoplasias malignas, em todo o país, no ano de 2014, tenha sido de R\$ 731.845.895,23. Destes, cerca de R\$ 156.000.000,00 foram gastos com as neoplasias malignas do cólon, reto e ânus (BRASIL, 2015).

Na cidade de Ribeirão Preto, entre os anos de 2002 e 2012, segundo informações do Observatório Regional de Atenção Hospitalar, o CCR foi responsável por 6286 internações hospitalares, com tempo médio de internação de 7,38 dias. Da mesma maneira, os tumores colorretais foram a causa de 528 óbitos, sendo a segunda neoplasia mais freqüente, tanto em relação ao número de óbitos quanto em relação ao número de internações associadas às neoplasias malignas (SÃO PAULO (ESTADO), 2016).

A idade média dos pacientes portadores de tumor de cólon ao diagnóstico é de 72 anos. Portanto, o risco de desenvolver câncer de cólon e reto entre pacientes com idade superior a 50 anos é cerca de 17 vezes superior, quando comparado a pacientes com menos de 50 anos de idade (BERNARDES et al., 2016).

Outro ponto importante dos tumores colorretais refere-se à relação inversamente proporcional entre sobrevida e estadiamento. Pacientes portadores de tumores de cólon tratados em estadio I apresentam sobrevida câncer específica, em 5 anos, de 100% e representam cerca de 12% do total de pacientes diagnosticados com CCR. Em contrapartida, entre 20 e 30% dos pacientes apresentam metástases à distância no momento do diagnóstico inicial, e destes apenas 10% estarão vivos após 5 anos (SIEGEL et al., 2014; UKEGJINI et al., 2016).

Dentre os diversos tipos histológicos dos tumores colorretais, o adenocarcinoma é o mais frequente e representa cerca de 90% dos casos, enquanto que entre os 10% restantes se enquadram outros tumores mais raros como tumor carcinóide, linfoma e carcinoma espinocelular (KANG et al., 2007).

1.3 Estadiamento

No intuito de universalizar a classificação do quão avançado ou precoce é um tumor, e assim permitir não apenas a comparação de diferentes casuísticas mas também a uniformização dos tratamentos, foram propostas diversas classificações.

A Classificação de Dukes, proposta em 1930 e modificada em 1954 por Astler-Coller, diferenciava seus pacientes quanto à extensão do tumor primário, à existência de acometimento tumoral linfonodal e à presença de metástases sistêmicas ao diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de Dukes modificada por Astler-Coller

Estadiamento	Descrição
A	Lesão não penetra a submucosa
B1	Lesão invade a muscular própria mas não a ultrapassa
B2	Lesão acomete toda a espessura da parede intestinal mas sem envolvimento de órgãos adjacentes
B3	Acometimento tumoral de órgãos adjacentes por continuidade/ contiguidade
C1	Lesão B1 com envolvimento linfonodal
C2	Lesão B2 com envolvimento linfonodal
C3	Lesão B3 com envolvimento linfonodal
D	Presença de metástase à distância

A mais difundida e utilizada delas, entretanto, a classificação criada pela *Union for International Cancer Control* (UICC) atualmente está em sua 7ª edição e leva em consideração informações sobre a disseminação do tumor primário, a presença/ausência de acometimento tumoral linfonodal secundário e sua quantificação, e a existência ou não de metástases sistêmicas, bem como a localização dos implantes secundários, cujo nome é resumido pela sigla TNM (ALLEGRA et al., 2011; SOBIN; COMPTON, 2010) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Estadiamento TNM, 7ª edição

TNM	Descrição
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade além da muscular própria e atinge os tecidos pericólicos não peritonizados
T4a	Tumor invade a serosa e atinge a superfície do peritônio visceral mas não invade estruturas e órgãos contíguos
T4b	Tumor que está aderido ou invade diretamente estruturas e órgãos adjacentes
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Não há evidência de metástase em linfonodos regionais
N1a	Presença de metástase em 1 linfonodo regional
N1b	Presença de metástase em 2 ou 3 linfonodos regionais
N1c	Depósitos tumorais na subserosa, mesentério ou nos tecidos não peritonizados pericólicos ou perirretais sem envolvimento linfonodal
N2a	Presença de metástase em 4 a 6 linfonodos regionais
N2b	Presença de metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
M0	Sem evidência de metástase à distância
M1a	Presença de metástase confinada a apenas um sítio
M1b	Presença de metástase em mais de um sítio ou na superfície peritoneal

Tabela 3 - Agrupamento por estadios, TNM, 7ª edição

Estadiamento	Descrição
0	Tis N0 M0
I	T1-2 N0 M0
IIA	T3 N0 M0
IIB	T4a N0 M0
IIC	T4b N0 M0
IIIA	T1-2 N1 M0; T1 N2a M0
IIIB	T3-4a N1 M0; T2-3 N2a M0; T1-2 N2b M0
IIIC	T4a N2a M0; T3-4 N2b M0; T4b N1-2 M0
IVA	Tis-4b Nx-2b M1a
IVB	Tis-4b Nx-2b M1b

1.4 Fatores prognósticos

Os tumores colorretais são considerados de bom prognóstico quando diagnosticados em estágios iniciais, com sobrevida global média de 5 anos, chegando a 65% (SIEGEL et al., 2012).

Mesmo entre os pacientes submetidos à cirurgia com intuito curativo, uma questão que possui importância singular é a recorrência tumoral, uma vez que 40 a 50% dos pacientes evoluem com recidiva sistêmica e morrem da doença metastática (ANDRE et al., 2007).

Estadiamento TNM (EC), grau de diferenciação (JASS et al., 2002a), presença de margens cirúrgicas positivas, subtipo histológico (SHEPHERD et al., 1989), tumores primários operados na vigência de perfuração ou obstrução intestinais, aneuploidia, presença de invasão linfovascular (ILV) ou perineural e número de linfonodos analisados no espécime cirúrgico inferior a 12, estão entre os parâmetros classicamente associados a um pior prognóstico oncológico (LE VOYER et al., 2003; LIEBIG et al., 2009; PRANDI et al., 2002; SATO et al., 2011).

O papel da timidilato sintetase (TS), uma enzima que atua sobre o processo da síntese de DNA, foi outro fator prognóstico estudado. Pacientes com CCR (EC II

de alto risco e EC III) submetidos a tratamento cirúrgico isolado com hiperexpressão da TS apresentam menor sobrevida global quando comparado a pacientes com hipoexpressão da enzima. Da mesma maneira, ao analisar especificamente os pacientes com hiperexpressão da TS, a realização de quimioterapia adjuvante trouxe benefício significativo na sobrevida global. Entretanto, à análise multivariada, a expressão da TS não demonstrou isoladamente impacto prognóstico (AGUIAR et al., 2005).

A presença de mutação no proto oncogene *Kirsten rat sarcoma virus*(*KRAS*) também tem sido associada a maior risco de metástase linfonodal, hepática e pulmonar (RIBEIRO et al., 2016).

Da mesma maneira, dois estudos colaborativos, somando quase 7000 pacientes, apontaram a presença da mutação no gene *KRAS* como associada ao pior prognóstico (ANDREYEV et al., 1998, 2001).

Em metanálise conduzida em pacientes com CCR, em vigência de quimioterapia e que compilou dados de 7 estudos, não ficou demonstrada a influência da presença de mutação no gene *KRAS* em desfechos oncológicos, tanto a curto quanto a longo prazos (RUI et al., 2013).

A descrença quanto à participação do gene *KRAS* mutado como marcador prognóstico foi reforçada quando pacientes com CCR em estágio clínico II e III também não demonstraram piores desfechos, quando comparados aos pacientes *KRAS* selvagem (ROTH et al., 2010).

Devido à existência de resultados conflitantes, portanto, ainda é incerta a relação entre a presença de mutação do *KRAS* e o prognóstico de pacientes portadores de CCR.

O gene *BRAF* codifica uma tirosina quinase da família RAF, e é associado à tumorigênese tanto em CCR quanto em outras neoplasias malignas (DAVIES et al., 2002). Cerca de 8% dos pacientes portadores de CCR apresentam uma mutação pontual (V600E) no gene *BRAF* (RAJAGOPALAN et al., 2002).

O gene *BRAF* não apresenta implicação prognóstica ampla (BOKEMEYER et al., 2012). Apenas em análises de subgrupos específicos, como em pacientes com estabilidade de microssatélite (MSS), a mutação do gene *BRAF* foi associada a pior prognóstico, quando comparada a pacientes *BRAF* selvagem, equiparada para estágios clínicos semelhantes (SAMOWITZ et al., 2005).

A quinase PIK3, envolvida no processo de sinalização celular, tem sido associada à tumorigênese do CCR (JEHAN et al., 2009; KATO et al., 2007). A ocorrência de mutação nessa quinase tem sido associada a pior prognóstico (OGINO et al., 2009). Sua aplicabilidade, entretanto, tem sido restrita a estudos clínicos e não vem sendo utilizada rotineiramente na assistência (HERZIG; TSIKITIS, 2015).

Mutações de perda de função do gene supressor tumoral *p53*, que atua na promoção de apoptose e restrição de angiogênese (VOUSDEN; PRIVES, 2009), foram associadas a maior risco de morte em pacientes portadores de neoplasias malignas colorretais. No entanto, devido a diversos vieses na metodologia de dosagem dessa mutação, gerando assim uma variação muito grande dos valores adotados como normais, é difícil ratificar um papel dessa mutação no prognóstico de pacientes com câncer de cólon e reto (MUNRO; LAIN; LANE, 2005).

O fenótipo metilador das ilhas de CpG tem sido outro fator estudado em relação a seu impacto sobre o prognóstico de pacientes portadores de tumores colorretais. Responsável por cerca de 18% dos tumores de cólon e reto esporádicos, atua através da hipermetilação de regiões promotoras dos genes, contribuindo para a transformação maligna (GALLOIS; LAURENT-PUIG; TAIEB, 2016). Associados a pior prognóstico quando presente em pacientes estadios clínicos II e III em alguns estudos (AHN et al., 2011; VAN RIJNSOEVEER et al., 2003; ZANUTTO et al., 2012), apresentaram resultados conflitantes em outros dois trabalhos (JOVER et al., 2011; LEE et al., 2015).

A análise de um aspecto genético específico nos CCR fornece importantes informações na condução dos pacientes. A combinação de diferentes aspectos genéticos desses tumores, entretanto, parece oferecer um substrato mais robusto na identificação de prognóstico e seleção de pacientes potencialmente elegíveis para tratamento adjuvante (BUDINSKA et al., 2013; DE SOUSA et al., 2013; MARISA et al., 2013; ROEPMAN et al., 2014; SADANANDAM et al., 2013).

Ao analisar uma casuística englobando 2720 pacientes com CCR estadio clínico III, especificamente, a combinação de mutações *BRAF*^{V600E}, *KRAS* e deficiência de proteínas de reparo do DNA (MMR) forneceu dados capazes de diferenciar esses pacientes em cinco subgrupos diferentes, com sobrevidas livre de doença distintas (Figura 1).

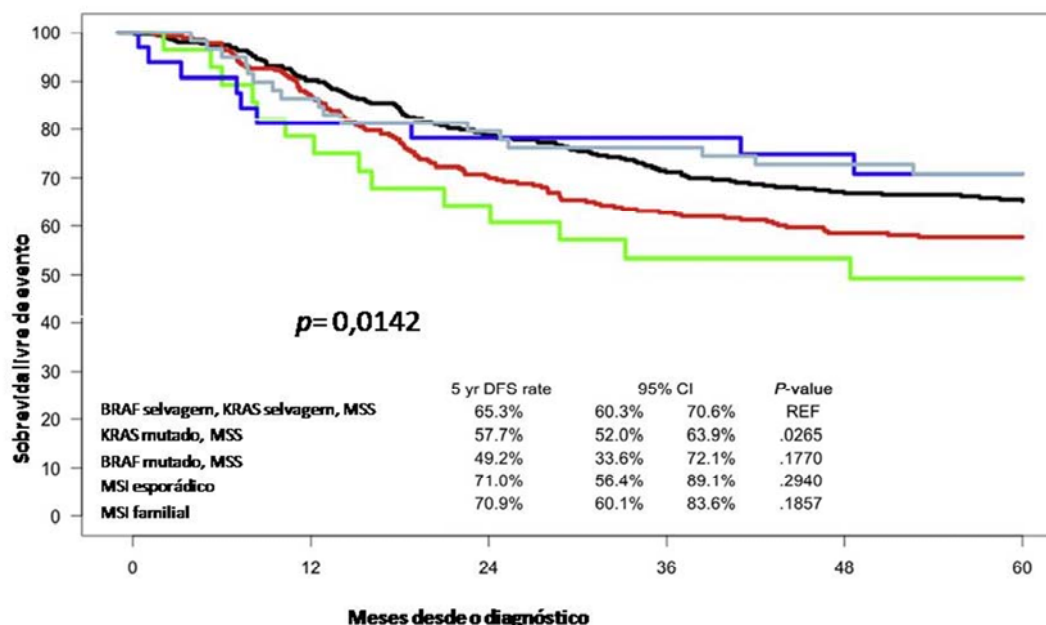


Figura 1 – Sobrevida livre de doença de acordo com o subtipo molecular em pacientes com CCR estadio clínico III. (modificado a partir de SINICROPE et al., 2016).

A classificação de tumores colorretais, baseada em subgrupos, pode representar a forma mais eficaz de enquadramento dos pacientes com CCR de acordo com seu prognóstico. Apesar de ainda carecer de validação, há um intenso esforço científico em unificar séries de pacientes para que os perfis moleculares sejam testados em diferentes populações e possam ser associados à prática clínica (SINICROPE et al., 2016).

1.5 Diferenças entre tumores de cólon e reto

Apesar de serem reunidos em um único grupo, os tumores de cólon e de reto parecem não demonstrar mesmos prognóstico e comportamento (ROCHA et al., 2016).

Quando inicialmente se avalia essas questões, a explicação referente às diferenças anatômicas locais aparentemente surge como uma maneira potencial de explicar os diferentes comportamentos biológicos dos tumores de cólon e reto (TAMAS

et al., 2015). Assim, os tumores de reto tendem a apresentar maior taxa de recidiva local devido à proximidade com a qual as estruturas pélvicas se encontram e à dificuldade cirúrgica em se realizar a excisão total do mesorreto (PEREZ et al., 2016).

Por outro lado, os tumores de cólon estão mais associados às recidivas peritoneais e hepáticas, o que poderia ser explicado devido à abundante drenagem venosa para o sistema porta e à origem embriológica do cólon (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

Por mais que a explicação anatomoembriológica seja válida, a real causa dessa diferença de comportamento ainda não está clara. Ao comparar a tumorigênese das neoplasias de cólon e reto em um estudo prospectivo com mais de 4000 pacientes, Smith et al. (2006) demonstraram que os tumores de reto provavelmente estariam associados a diferentes vias de tumorigênese daquelas evidenciadas em tumores de cólon.

Corroborando essa conclusão, Frattini et al. (2004) comprovaram que tumores de cólon demonstram mais comumente mutações no gene *KRAS* e obedecem à teoria proposta por Volgestein, detalhada posteriormente no item tumorigênese. Em contrapartida, tumores de reto apresentam menor número de mutações e mais frequentemente estão associados a alterações no gene *APC* (FRATTINI et al., 2004).

1.6 Tumorigênese

No âmbito evolutivo, o câncer pode ser um exemplo do processo de seleção natural de uma célula. Na busca pela imortalidade, a célula neoplásica adquire formas de escape aos processos de diferenciação tecidual, multiplicação celular e apoptose, sobrepujando-se em relação aos seus pares a nível tecidual (DEVITA; LAWRENCE; ROSENBERG, 2008).

Esclarecer por completo os mecanismos envolvidos no surgimento do câncer é um desafio até os dias de hoje. Um dos grandes avanços obtidos em direção à elucidação dessa questão deu-se há cerca de 20 anos, quando os chamados genes supressores de tumor (genes com capacidade de supressão tumoral e que sofrem mutações de perdas de função) e os proto-oncogenes (genes com capacidade de

permitir ou facilitar o surgimento de tumores e que sofrem mutações de ganho de função) foram descritos, e sua participação associada ao fenótipo do tumor (BISHOP; WEINBERG, 1996).

Apesar dessas constatações terem sido feitas a partir de estudos em modelos experimentais, a atenção que passou a ser dada aos mecanismos responsáveis pela capacidade de uma célula multiplicar-se indefinidamente, invadir os tecidos adjacentes e migrar para outros órgãos à distância foi brutal.

Prova disso foi a proposição de que, independente do sítio primário e subtipo histológico, a maioria ou praticamente toda neoplasia maligna seria o resultado de seis principais alterações no funcionamento da célula: contínua sinalização de proliferação, escape aos sinais de inibição de crescimento celular, indiferença ao processo de apoptose, potencial de multiplicação ilimitado, permanente angiogênese e ativação de invasão tecidual e metastatização (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2000).



Figura 2 - Seis alterações celulares associadas à tumorigênese propostas inicialmente (Modificado a partir de HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Recentes estudos corroboraram a ocorrência de sucessivas mutações em célula normal e que a levam, progressivamente, a se transformar em uma célula neoplásica maligna (ADAMS; CORY, 2007; BERX; VAN ROY, 2009; BLASCO, 2005; BURKHART; SAGE, 2008; CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; DESHPANDE; SICINSKI; HINDS, 2005; EVAN; LITTLEWOOD, 1998; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; LOWE; CEPERO; EVAN, 2004; PERONA, 2006; SHAY; WRIGHT, 2000; SHERR; MCCORMICK, 2002).

Adicionalmente, o surgimento do câncer também estaria relacionado a outros quatro fenômenos: ajuste do metabolismo celular no intuito de facilitar o crescimento tumoral, capacidade de escape ao sistema imune do hospedeiro, aquisição de mutações genéticas adicionais pelas células tumorais e estímulo contínuo à inflamação tecidual (Figura 3) (COLOTTA et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010).

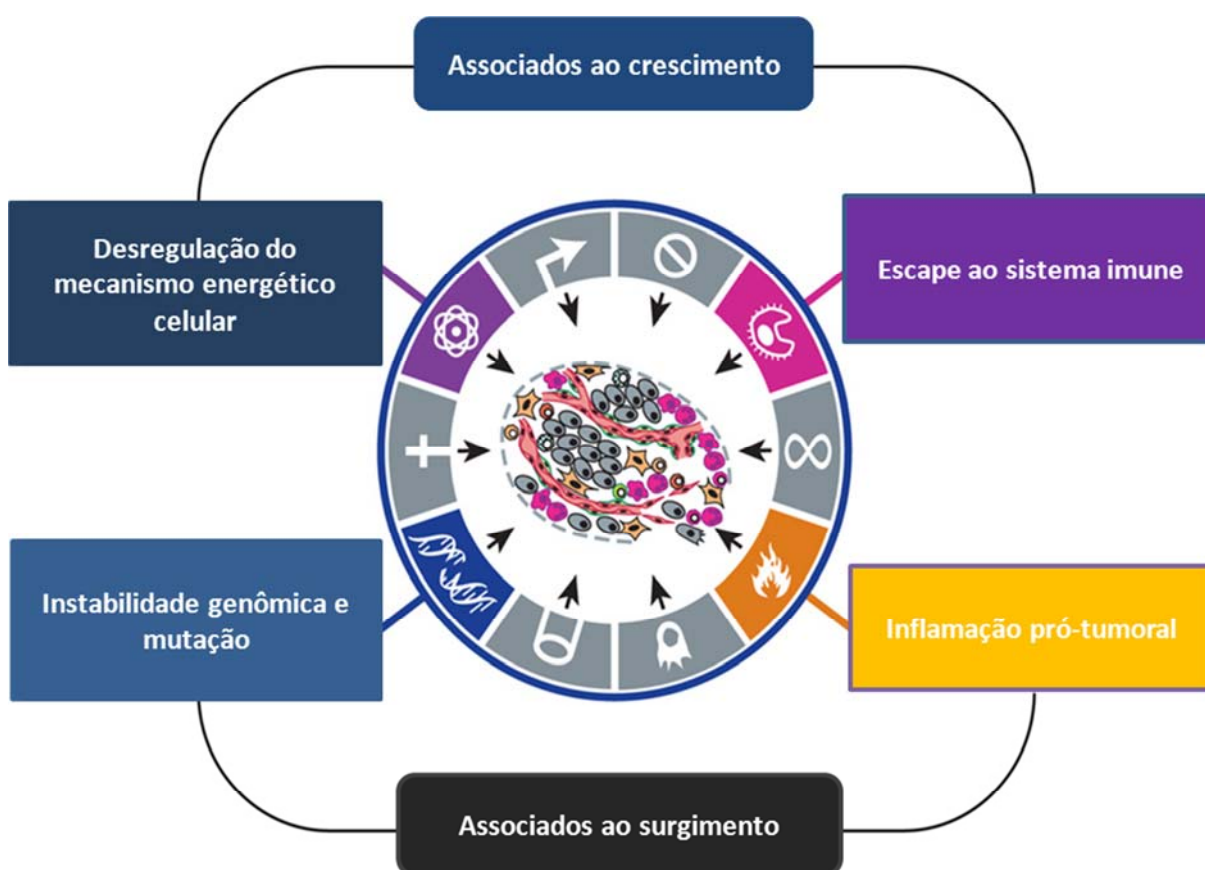


Figura 3 - Quatro alterações celulares adicionais associadas à tumorigênese (Modificado a partir de HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Quando se analisa a gênese do CCR especificamente, observa-se que esse tipo de neoplasia representa um modelo bastante útil da aquisição de sucessivas alterações dos mecanismos celulares até a ocorrência de uma célula neoplásica maligna. Isso se deve ao fato de que boa parte das neoplasias malignas invasoras colorretais deriva-se de um adenoma colônico. Além disso, graças ao fato de neoplasias colorretais em vários estágios serem analisadas, torna-se possível a identificação de mutações progressivamente acumuladas em cada estágio da tumorigênese colorretal (NOWELL, 1986).

A ocorrência de mutações no gene *RAS* e de deleções em alelos dos cromossomos 5, 17 e 18 em 172 espécimes de tumores de cólon, publicada em 1988, representou um marco no estudo da tumorigênese do CCR. A partir desse trabalho, o papel do acúmulo progressivo de alterações genéticas em um adenoma colônico em proto oncogenes e genes supressores de tumor passou a ser bastante discutido (VOGELSTEIN et al., 1988).

A demonstraçãode que a perda de função do gene *p53*, localizado no cromossomo 17, estava associada ao surgimento do CCR foi outra conquista atingida na busca pela identificação dos genes envolvidos especificamente na tumorigênese colorretal (CHO; VOGELSTEIN, 1992b).

Na mesma linha de raciocínio, o gene *DCC* passou a ser associado à tumorigênese do CCR devido à existência de mutações de perda de função desse gene supressor de tumor localizado no cromossomo 18 e identificado em tecido tumoral. O gene *DCC*, que apresenta grande similaridade com moléculas de células neurais e outras glicoproteínas da superfície celular, atuaria nas interações célula-célula e célula-substrato, contribuindo assim ao fenótipo do tumor (CHO; VOGELSTEIN, 1992a).

O cromossomo 5, através do gene *MCC*, também foi associado à gênese do CCR. Mutações pontuais na região codificante do gene estariam associadas ao processo de sinalização celular, fato postulado devido à semelhança desse gene com outras moléculas da família da proteína-G (LECHLEITER et al., 1990).

A instabilidade cromossômica, caracterizada pela ocorrência de uma ou mais mutações de perda ou ganho de função, demonstrou estar presente mesmo em CCR em estagios iniciais. Em um estudo com 32 espécimes de neoplasias colorretais, 67% das amostras apresentaram ao menos uma mutação nos alelos 1p, 8p, 15q e 18q (SHIH et al., 2001).

Assim, a década de 90 começou com uma publicação histórica: a proposição da teoria adenoma-adenocarcinoma na tumorigênese do CCR. Segundo a teoria, pólipos adenomatosos colorretais, ao acumularem alterações genéticas de ativação de proto-oncogenes e perdas de função de genes supressores de tumor, resultariam no surgimento de neoplasias malignas invasoras colorretais (Figura 4) (FEARON; VOGELSTEIN, 1990).

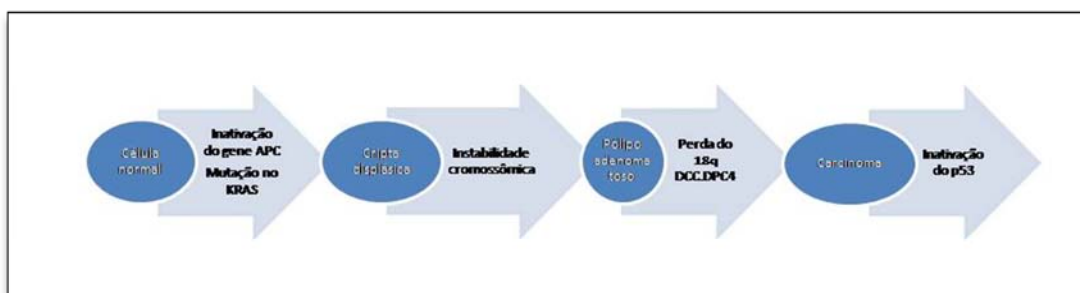


Figura 4 - Teoria adenoma-adenocarcinoma proposta para tumores colorretais (modificado a partir de FEARON; VOGELSTEIN, 1990).

Tradicionalmente, a via molecular associada à instabilidade cromossômica e explicada através da sequência adenoma-adenocarcinoma na tumorigênese do CCR passou a ser chamada de via supressora (WORTHLEY et al., 2007).

Além da instabilidade cromossômica, a implicação dos sistemas de controle da integridade do DNA na tumorigênese do CCR também passou a receber atenção. Assim, a proposição de que genes de reparo do DNA estariam mutados, em uma parcela significativa dos casos de CCR esporádico, elevou a instabilidade de microsatélite a um posto importante na gênese das neoplasias malignas do cólon e reto (IONOV et al., 1993).

Nesse contexto, torna-se pertinente conceituar que microsatélites são pequenas sequências repetitivas de DNA em *tandem* localizadas nos cromossomos. Assim, quando há um defeito primário dos genes de reparo do DNA, a DNA polimerase não consegue reparar esses microsatélites, e estes acabam acumulando-se nos cromossomos (THIBODEAU; BREN; SCHAID, 1993).

Tumores caracterizados pela presença de instabilidade de microsatélites (MSI) foram relacionados tanto a mutações nos genes *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* e *hPMS2* quanto ao silenciamento de genes de reparo do DNA através de metilação pelo fenótipo metilador de ilhas de CpG (COHEN et al.,

2016; KIM, J. H. et al., 2016). Além disso, as células dos tumores com MSI demonstram entre 100 e 1000 vezes mais mutações nas sequências microssatélites quando comparadas a células tumorais que não apresentam defeitos nos genes de reparo (HOEIJMAKERS, 2001).

Por outro lado, quando avaliada a ocorrência de alterações citogenéticas na célula tumoral, as neoplasias com MSI demonstram baixos índices de aneuploidia. De maneira semelhante, a frequência de mutações nos genes *APC*, *KRAS* e *p53* e as perdas de alelos envolvidos com a sequência adenoma-adenocarcinoma como 5q, 17p e 18q (JASS et al., 2002b) são bastante reduzidas ou até mesmo ausentes nos tumores com MSI (PAWLIK; RAUT; RODRIGUEZ-BIGAS, 2004).

Todas essas importantes diferenças citogenéticas entre os tumores com MSI e os tumores explicados pela sequência adenoma-adenocarcinoma motivou a proposição de que estaríamos diante de uma via alternativa, ou mutada, na tumorigênese colorretal (MORAN et al., 2010).

Outra classificação posterior, baseada na frequência de mutações em sequências de microssatélite, passou a ser adotada. Essa nova classificação consensual baseia na ocorrência ou não de mutações de inserção/ deleção em 5 sequências específicas de microssatélites: *BAT26*, *A4725*, *D5S346*, *D2S123E* e *D17S250*. Aqueles tumores que apresentam mutações em duas ou mais dessas sequências são classificados como tumores com elevada instabilidade de microssatélite (MSI-H). Quando o tumor demonstra mutações em apenas uma dessas sequências, é classificado como tumor com baixa instabilidade de microssatélite (MSI-L). Por outro lado, quando o tumor não apresenta mutações em nenhuma dessas sequências, é classificado como um tumor com estabilidade de microssatélite (MSS) (BOLAND et al., 1998).

Com o desenvolver das pesquisas em torno de tumores colorretais, importantes diferenças clínico-patológicas dos CCR com MSI-H passaram a ser identificadas. Apesar de discutível, do ponto de vista de idade ao diagnóstico, pacientes com tumores com MSI-H tendem a apresentar idade inferior a 55 anos ou superior a 70 anos (JEONG et al., 2003; RIBIC et al., 2003; SAMOWITZ et al., 2001).

Tumores com MSI-H também tendem a acometer mais comumente o cólon proximal (SUH et al., 2002), predominar no sexo feminino (ANDERSEN et al., 2016) e apresentar menores índices de acometimento tumoral linfonodal (SOREIDE et al., 2009).

Quando avaliados os tumores colorretais de intervalo (CCR diagnosticados até 5 anos após realização de colonoscopia de rastreamento para câncer de cólon e reto, sem achados positivos na ocasião do primeiro exame), a frequência de MSI é elevada (LEE et al., 2016). Apesar de paradoxal, por serem associados a um menor tempo de surgimento do que os tumores que seguem a via supressora, os tumores caracterizados por MSI-H tem sido associados a melhor prognóstico quando comparados a tumores que demonstram MSI-L e MSS (BERTAGNOLLI et al., 2011; JUNG; KIM; KIM, 2016; KIM, C. G. et al., 2016; MEROK et al., 2013).

Muito embora cerca de 80% dos casos de CCR esporádico possam ser explicados pela via supressora (HILL; MORSON; BUSSEY, 1978), e outros 15% dos casos apresentem em sua tumorigênese a participação da via mutada (FEARON, 2011), é bastante difícil tentar resumir uma questão tão complexa quanto o surgimento de um câncer a apenas duas teorias e que ambas sejam excludentes entre si.

Paralelo a isso, a constatação de que mesmo um único tumor maligno colorretal pode demonstrar diferentes aspectos histológicos e moleculares de acordo com a porção do tumor que seja analisada, gerou maior dúvida na comunidade científica (BETTONI et al., 2016; BRATTAIN et al., 1984; LINNEKAMP et al., 2015).

Assim, a existência de heterogeneidade intratumoral, somada à dificuldade de aceitação do surgimento de uma neoplasia maligna colorretal através de uma única via de tumorigênese, deram forças à ascensão da teoria do *big bang* e à participação de células tronco tumorais (Figura 5).

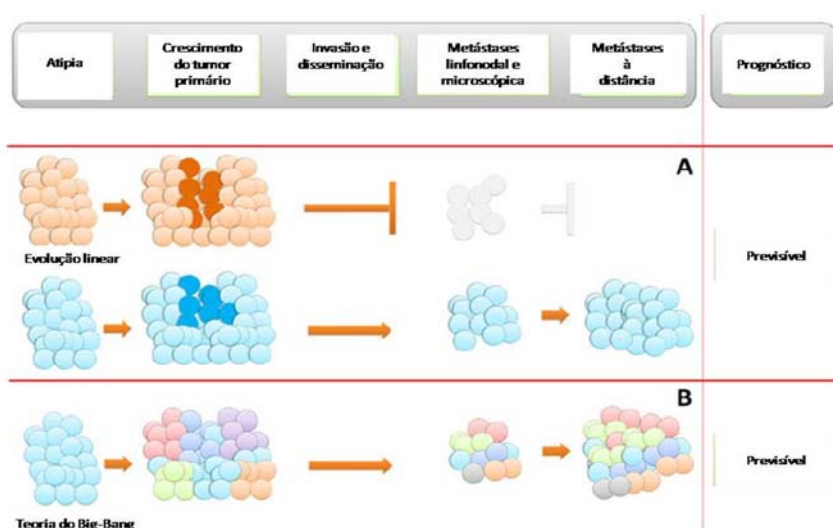


Figura 5 - Desenho esquemático da participação de células tronco-tumorais no surgimento de tumores colorretais (modificado a partir de SOTTORIVA et al., 2015).

Essa intrigante teoria que envolve a participação das células tronco- tumorais associa o fato de que apenas uma pequena parte das células que compõe um tumor demonstra capacidade para gerá-lo (LAPIDOT et al., 1994), o que foi corroborado em pesquisas envolvendo CCR (BOTCHKINA et al., 2009; HUMPHRIES et al., 2013; O'BRIEN et al., 2007).

Sob essa ótica, diferentes células que compõem o tumor em sua origem, sofreriam mutações distintas e seguiriam concomitantemente vias de tumorigênese diferentes, multiplicando-se sucessivamente e levando à formação da neoplasia maligna macroscópica. Entretanto, a origem dessas células tronco tumorais, sua prevalência no tecido tumoral e sua contribuição nos processos de invasão tecidual e metástase ainda permanecem incertos (Figura 6).

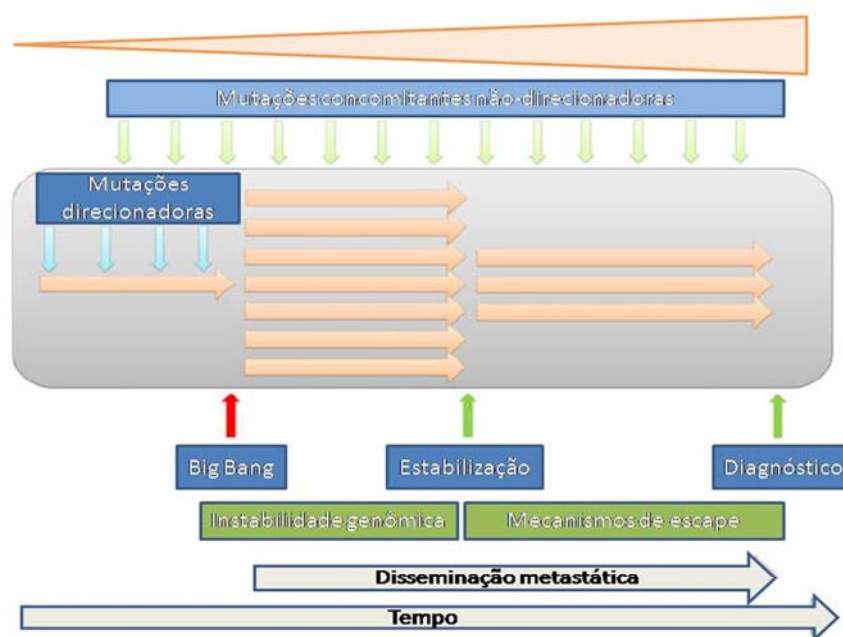


Figura 6 - Desenho esquemático da teoria do big bang no surgimento de tumores colorretais (modificado a partir de AMARO et al., 2016).

1.7 Implicação de microRNA no câncer de cólon

Na busca pelos fatores reguladores de importantes mecanismos celulares, foram descobertas fitas simples de RNA não codificantes contendo de 20 a 24 nucleotídeos, chamadas de microRNA (miRNA) (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993).

Atuando a nível pós-transcricional, os miRNA são responsáveis pelo controle de numerosas funções celulares, como por exemplo, proliferação celular, controle do ciclo celular, metabolismo e apoptose (Figura 7) (BARTEL, 2004; KAVITHA et al., 2014; SCHEPELER et al., 2008).

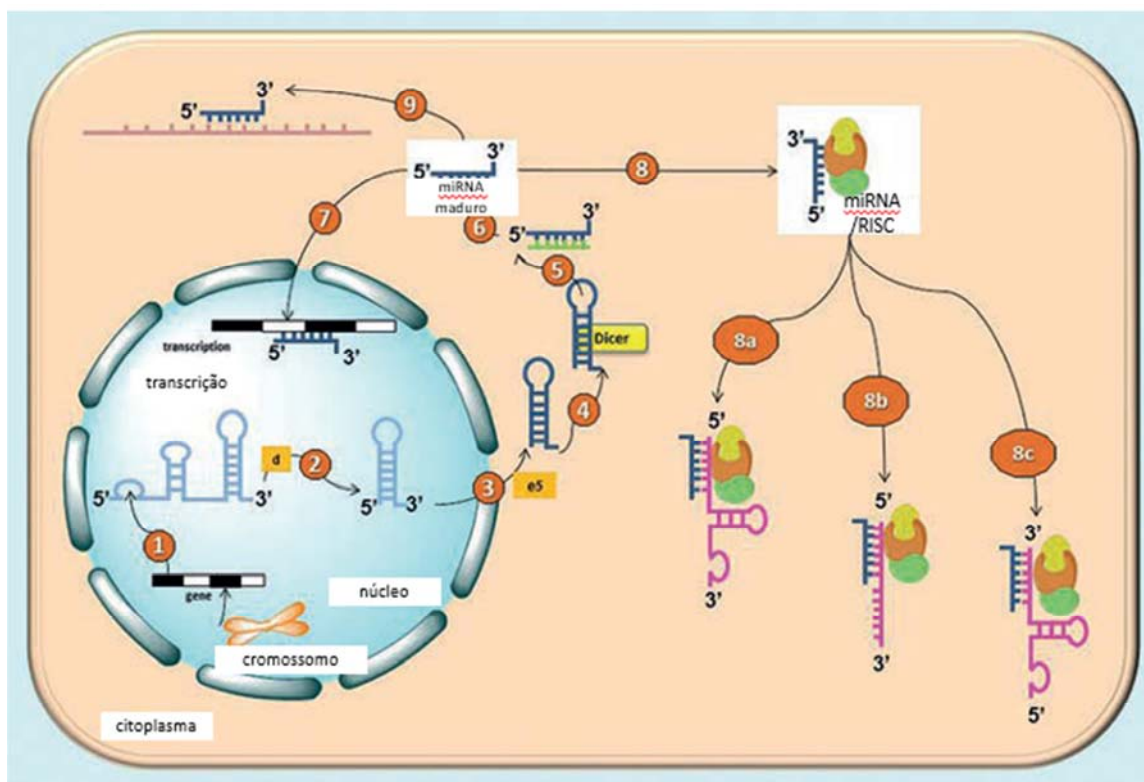


Figura 7 - Processo de síntese e nível de atuação de miRNA (modificado a partir de YAN et al., 2015).

Postula-se que um único miRNA, por possuir sequência pequena de nucleotídeos e não necessitar de pareamento completo, possa regular entre centenas e milhares de RNA mensageiros (RNAm) distintos capazes de exercer diversas funções, formando assim uma enorme e complexa rede regulatória de sinalização celular (AMIRKHAH et al., 2015; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

Especificamente em câncer de cólon, diferentes perfis de expressão de miRNA foram associados a tumores com mutação sobre o *p53*, *KRAS*, *BRAF*, fenótipo metilador de ilhas de CpG e MSI. O impacto desses perfis de expressão de miRNA sobre o prognóstico, entretanto, ainda tem sido avaliado (SLATTERY et al., 2016).

Identificar quais miRNA podem desempenhar um importante papel sobre o prognóstico dos pacientes portadores de tumor de cólon é algo desafiador. Mesmo a literatura específica sobre o tema ainda apresenta resultados conflitantes em relação ao papel de cada miRNA sobre os desfechos oncológicos do câncer de cólon, e estudos complementares têm sido encorajados (ALMEIDA et al., 2016).

Entre os diversos miRNA associados aos tumores colônicos estudados, o miRNA-92a, o miRNA-133a e o miRNA-145 têm demonstrado resultados promissores e por isso foram escolhidos para compor esse trabalho.

Associado à proliferação, invasão e migração, o miRNA-92a tem se mostrado hiperexpresso em tumores de esôfago e de cólon (CHEN et al., 2011; ZHANG, G. et al., 2014) e associado a desfechos prognósticos (KE et al., 2015).

O miRNA-133a, entretanto, tem sido associado a neoplasias malignas gastrointestinais, pulmonares, de cabeça e pescoço e de mama, atuando como um miRNA supressor de tumor ao regular mecanismos de proliferação, migração, invasão e apoptose (LAI; CHEN; LI, 2015; QIN et al., 2013; WANG et al., 2014; WANG, G. et al., 2015; WU et al., 2012).

De maneira semelhante, a hipoeexpressão do miRNA-145 também tem sido demonstrada em amostras de tumores colorretais quando comparada a tecido colônico sadio adjacente (LI et al., 2014; MA et al., 2012).

Conseguir prever o comportamento do tumor e assim vislumbrar a evolução clínica do paciente é uma tarefa árdua. De posse dos atuais sistemas de estadiamento, ainda não é possível de maneira eficaz prever esse comportamento. A biologia molecular, através dos miRNA, pode contribuir na identificação do perfil tumoral e ajudar a prever os desfechos clínicos.

Diante desse desafio, esse trabalho surge como uma tentativa à contribuição científica em busca da elucidação de marcadores prognósticos para pacientes com câncer de cólon.

2 OBJETIVOS

- Determinar a expressão do miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 em amostras de tecido tumoral de pacientes portadores de câncer de cólon, comparando-os com a expressão desses miRNA em pacientes hígidos.
- Estudar a associação entre a expressão tecidual do miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 e variáveis clínico-patológicas (valor de CEA pré-tratamento, estadiamento TNM, presença de invasão linfovascular e idade ao diagnóstico), sobrevida global e sobrevida livre de doença.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Classificação do tipo de pesquisa, desenho geral do estudo e casuística

O projeto realizado entre fevereiro de 2015 e julho de 2016 foi um estudo do tipo transversal, descritivo e quantitativo, aprovado pelo CEP sob o processo N° 1.353.739

Em relação à casuística, foram incluídos no grupo arbitrariamente chamado de grupo de estudo, pacientes de ambos gêneros, portadores de câncer esporádico de cólon e submetidos à ressecção cirúrgica do tumor primário, atendidos pela Divisão de Coloproctologia, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2011 no HCFMRP-USP.

Ainda em relação à casuística, foram excluídos do estudo: (1) pacientes com tumores de cólon sincrônicos; (2) pacientes previamente diagnosticados como portadores de síndromes genéticas associadas ao surgimento de CCR; (3) pacientes cuja cirurgia realizada no período do estudo foi decorrente de recidiva tumoral de câncer de cólon tratado previamente; (4) pacientes portadores de outra neoplasia maligna prévia; (5) pacientes portadores de tumores reto localizados a distância menor ou igual a 12cm da margem anal; (6) pacientes cujas amostras de tecido tumoral disponíveis não fossem suficientes para a realização de quantificação do miRNA.

Do total de pacientes inicialmente incluídos, 50 pacientes respeitaram os critérios de exclusão e compuseram o grupo de estudo.

Para integrar o grupo arbitrariamente designado de grupo controle, foram alocados pacientes voluntários hígidos submetidos à colonoscopia para rastreio de câncer colorretal, desde que não apresentassem os seguintes fatores: (1) história prévia de neoplasia maligna, independente do sítio primário; (2) idade superior a 18 anos; (3) diagnóstico prévio de síndrome genética associada ao surgimento de CCR; (4) diagnóstico prévio ou atual de doença inflamatória intestinal; (5) ter entendido e consentido com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado.

Do total de pacientes hígidos potencialmente elegíveis aos quais foi aplicado o TCLE e feita entrevista para descartar os fatores de exclusão, 20 pacientes atenderam aos requisitos e compuseram o grupo controle.

3.2 Coleta de amostras do grupo controle

No momento em que foram submetidos à colonoscopia para rastreamento de câncer colorretal, após preparo intestinal e sedação rotineiras aplicados pelos médicos da Divisão de Coloproctologia, foram coletadas três amostras de tecido colônico sadio em cada uma das topografias (cólon direito, cólon transversal e cólon esquerdo).

As amostras coletadas foram identificadas e acondicionadas em frascos devidamente rotulados para cada paciente e separadas conforme topografia que foram retiradas. Em sequência, os frascos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e encaminhados para acondicionamento.

As amostras foram acondicionadas em um biorrepositório, conforme orientação do CEP e em adequação à resolução vigente (466/12 e 441/11).

3.3 Coleta de amostras do grupo de estudo

No momento em que os pacientes do grupo de estudo foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor primário, amostras de tecido tumoral foram coletadas e acondicionadas em criotubos.

Em sequência, os frascos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e também encaminhados para acondicionamento em nitrogênio líquido no Banco de Tumores Proctológicos do HCFMRP-USP.

3.4 Coleta de dados clínicos

Os dados clínicos foram coletados a partir de revisão dos prontuários eletrônico e físico, no caso dos pacientes que integram o grupo de estudo, realizado junto ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HCFMRP-USP.

Por sua vez, entre os pacientes do grupo controle, os dados clínicos foram coletados no momento da entrevista e aplicação do TCLE.

3.5 Detalhamento técnico da dosagem de miRNA

Às amostras foram adicionados 250µl de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentamos então 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a -80°C. Após este passo foi seguido o protocolo para purificação utilizando Kit mirVana para extração do RNA, onde os pequenos e grandes RNAs foram purificados em uma fração, sem separação para enriquecimento de pequenos RNAs.

Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Thermo Scientific NanoDrop 2000). Além da concentração de ácidos nucleicos presente na amostra, obtivemos um valor da razão referente à pureza das amostras (razão 260/280). A faixa obtida para nossas amostras foi de 1,61 a 1,99. Ao final desta etapa, foi analisada a integridade de cada amostra (*Agilent 2100 Bioanalyser* - Agilent Technologies).

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 5ng de RNA, adicionou-se 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0 µl de dNTP's; 2,5µl de Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, completando com água DEPC para um volume final de 20µl. Em seguida, o material foi levado ao termociclador nas condições padrão (30 minutos à 16 °C para efetuar a desnaturação do DNA, 30 minutos à 42 °C para a extensão da cadeia, 5 minutos à 85 °C para a desativação

da enzima e, em seguida, à 4 °C), onde o cDNA foi sintetizado a partir do RNA das amostras.

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial. A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por RT-PCR, com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores do *threshold cycle* (Ct) determinados para as diferentes amostras, foram normatizados. O Ct determinado para um determinado miRNA foi subtraído do Ct determinado para um gene house-keeping da mesma amostra, originando o chamado Δ Ct. Os valores de Δ Ct podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras.

A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o Δ Ct de uma amostra do Δ Ct do calibrador, neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta$ Ct. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, foi obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foi estabelecido um *threshold* de 0,1 para o endógeno e também para o gene estudado e o desvio entre as amostras considerado foi de até 0,5.

Realizamos a quantificação relativa dos miRNA, onde as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA.

Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 FAST (Applied Biosystems) foi utilizado. As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores da expressão.

3.6 Análise estatística

Para as variáveis contínuas que apresentaram perfil de distribuição normal, os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Do contrário, foram expressos através de mediana e valores máximo e mínimo. As variáveis categóricas foram expressas através da frequência absoluta e porcentagem.

Por sua vez, para a análise comparativa dos resultados foram utilizados os testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* para grupos não pareados e de distribuição não Gaussiana.

Ainda em relação à análise estatística, os programas *Graphpad Prism 6.0* e *SPSS 20.0* foram utilizados na confecção dos gráficos e análise estatística, admitindo-se significância estatística valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Dentre os 50 pacientes que foram incluídos no grupo de estudo, a idade média foi de 66 anos (34-88 anos). As tabelas 4 e 5 resumem os dados clínicos, fatores histológicos e desfechos oncológicos da série de pacientes.

Tabela 4 - Dados clínicos do grupo de estudo

Característica	Frequência n (%)
Gênero	30 (60%)
Masculino	20 (40.%)
Feminino	
Cor	
Branco	45 (90%)
Negro	4 (8%)
Asiático	1 (2%)
Classificação de ASA*	7 (14%)
I	36 (72%)
II	7 (14%)
III	
Dosagem sérica de CEA (ng/mL)	
≥ 5.0	23 (46%)
< 5.0	27 (54%)
Localização do tumor primário	
Cólon direito	14 (28%)
Cólon transverso	7 (14%)
Cólon descendente	7 (14%)
Cólon sigmóide	22 (44.%)

* Sistema de Classificação de comorbidades da *American Society of Anesthesiologists*

Tabela 5 - Fatores histológicos e desfechos oncológicos do grupo de estudo

Característica	Frequência n (%)
Estadiamento TNM	
Estágio I	7 (14%)
Estágio II	17 (34%)
Estágio III	15 (30%)
Estágio IV	11 (22%)
Sítio de metástase ao diagnóstico (n=11)	
Fígado	4 (36.3%)
Fígado	2 (18.2%)
Fígado e pulmão sincrônicos	2 (18.2%)
Fígado e peritônio sincrônicos	1 (9.1%)
Pulmão	2 (18.2%)
Peritônio	
Invasão linfovascular	
Presente	18 (36%)
Ausente	29 (58%)
Não avaliada	3 (6%)
Grau de diferenciação tumoral	
Bem diferenciado	7 (14.%)
Moderadamente diferenciado	36 (72%)
Pouco diferenciado	5 (10%)
Não avaliada	2 (4%)
Diferenciação mucinosa	
Presente	13 (26%)
Ausente	35 (70%)
Não avaliada	2 (4%)
Número de linfonodos ressecados	
Média	12,2 (1-46)
Margens cirúrgicas	
R0	40 (80%)
R1	1 (2%)
R2	9 (18%)
Recorrência tumoral (n= 41)	
Presente	5 (12,2%)
Ausente	36 (87,8%)
Sítio de recorrência tumoral	
Fígado	1 (20%)
Pulmão	1 (20%)
Peritônio	3 (60%)

O tempo médio de seguimento foi de 46 meses. A sobrevida livre da doença foi de 32 meses, variando de 0 a 60 meses. A sobrevida global foi de 46 meses, variando de 1 a 62 meses.

Dentre os 50 pacientes do grupo de estudo, 31 estavam vivos no mês de junho de 2016. De acordo com o estadiamento, 41,2% dos pacientes estadio II faleceram durante o período de seguimento. Por outro lado, entre os pacientes estadio III, $\frac{3}{4}$ encontram-se vivos. Já entre os pacientes estadio IV, apenas 27,3% estavam vivos durante o período de realização do estudo, conforme observado na curva de Kaplan-Meier (Figura 5).

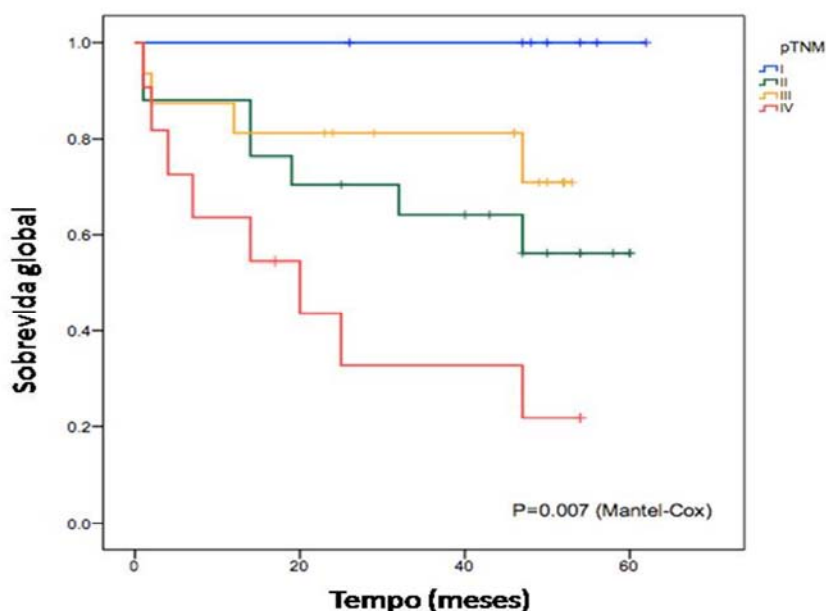


Figura 8 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global por estadios

Análise univariada realizada para se buscar fatores associados à recorrência tumoral não evidenciou associação entre idade, dosagem sérica de CEA, envolvimento linfonodal, presença de metástase ao diagnóstico, margens cirúrgicas, invasão linfovascular, diferenciação mucinosa e grau de diferenciação.

Por outro lado, a morte esteve associada a níveis sérios de CEA iguais ou superiores a 5 ng/dL, presença de metástase ao diagnóstico, margens cirúrgicas comprometidas e tumores pouco diferenciados na análise univariada. Após análise multivariada, a ocorrência de margens cirúrgicas comprometidas foi identificada como fator de risco independente para morte por câncer ($p=0.003$; IC 95%), conforme resumido na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise univariada para risco de recorrência tumoral ou morte por câncer

Variáveis independentes	Recorrência <i>n</i> (%)	<i>p</i> *	Morte por câncer <i>n</i> (%)	<i>p</i> *
Idade (anos)				
≥ 60	2 (5.6%)	0.144	12 (33.3%)	0.526
<60	3 (20%)		7 (46.7%)	
Dosagem sérica de CEA (ng/dl)				
≥ 5	3 (12.5%)	0.656	14 (58.3%)	0.004
<5	2 (7.4%)		5 (18.5%)	
Metástase linfonodal				
Ausente	3 (12.5%)	0.661	8 (33.3%)	0.570
Presente	2 (7.7%)		11 (42.3%)	
Metástase ao diagnóstico				
Ausente	5 (12.5%)	0.572	11 (27.5%)	0.012
Presente	0 (0%)		8 (72.7%)	
Margens cirúrgicas				
Livres	4 (9.8%)	1.000	10 (24.4%)	<0.001
Comprometidas	1 (10%)		9 (90%)	
Invasão linfovascular				
Ausente	3 (10.3%)	1.000	7 (24.1%)	0.065
Presente	1 (5.3%)		10 (52.6%)	
Diferenciação mucinosa				
Ausente	3 (8.3%)	0.598	11 (30.6%)	0.184
Presente	2 (15.4%)		7 (53.8%)	
Grau de diferenciação tumoral				
Bem diferenciado	3 (7.1%)	0.472	12 (28.6%)	0.041
Pouco/ Moderadamente diferenciado	1 (14.3%)		5 (71.4%)	

* Teste exato de Fisher

Em relação aos resultados laboratoriais, o miRNA-92a revelou estar hiperexpresso nos pacientes do grupo de estudo comparado aos pacientes do grupo controle, entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,3526$) (Figura 9).

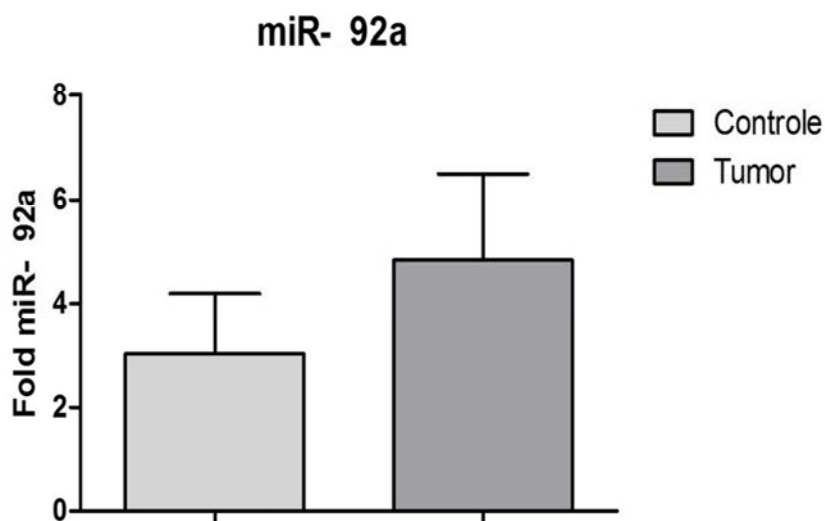


Figura 9 - Fold de dosagem de miRNA-92a nos pacientes do grupo controle e do grupo de estudo

Ao contrário, o miRNA-133a demonstrou valores maiores no grupo controle quando comparado ao grupo de estudo, com valor de p significativo ($p=0,0007$) (Figura 10).

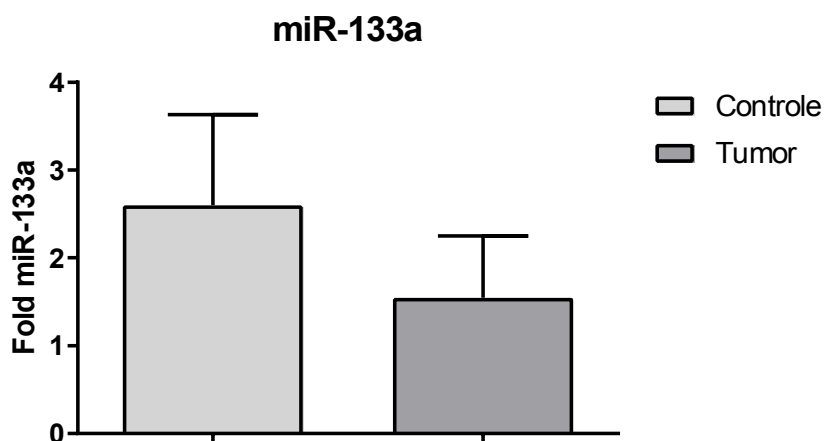


Figura 10 - Fold de dosagem de miRNA-133a nos pacientes do grupo controle e do grupo de estudo

O miRNA-145, por sua vez, demonstrou valores maiores de dosagem nos pacientes do grupo de estudo, mas sem significância estatística ($p= 0,1546$) (Figura 11).

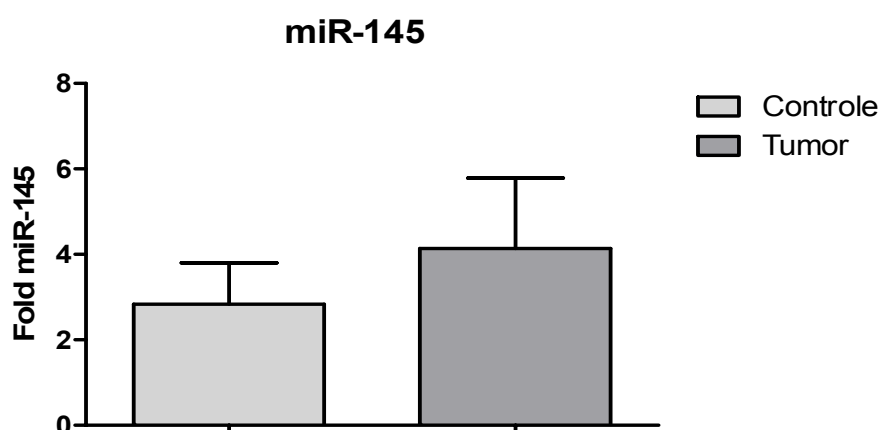


Figura 11 - Fold de dosagem de miRNA-145 nos pacientes do grupo controle e do grupo de estudo

Ao comparar-se hiperexpressão de miRNA-92a e dosagem sérica de CEA ao diagnóstico, 65,4% dos pacientes hiperexpressos apresentaram CEA < 5, enquanto que 34,6% dos pacientes apresentaram CEA \geq 5 ($p= 0,155$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Expressão de miRNA-92a e valor de CEA ao diagnóstico

Variável	EXPRESSÃO miRNA-92a	
	Não Hiper Expresso <i>n</i> (%)	Hiper Expresso <i>n</i> (%)
CEA	< 5 ng/dL	10 (41,6%)
	\geq 5 ng/dL	14 (58,4%)

Ao comparar-se hiperexpressão de miRNA-92a e idade, 30,8% dos pacientes hiperexpressos apresentaram idade inferior a 60 anos, e 69,2% apresentaram idade igual ou superior a 60 anos ($p= 1,000$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Expressão de miRNA-92a e idade ao diagnóstico

Variável	EXPRESSÃO miRNA-92a		
	Não Hiper Expresso n(%)	Hiper Expresso n(%)	
Idade	<60 anos	7 (29,2%)	8 (30,8%)
	≥ 60 anos	17 (70,8%)	18 (69,2%)

Ao comparar-se hiperexpressão de miRNA-92a e estadiamento, 53,8% dos pacientes hiperexpressos foram diagnosticados ainda em estadio clínico I e II (precoces), enquanto que 46,2% apresentaram doença avançada ao momento do diagnóstico (estadio clínico III e IV) ($p= 0,413$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Expressão de miRNA-92a e estadiamento

Variável	EXPRESSÃO miRNA-92a		
	Não Hiper Expresso n(%)	Hiper Expresso n(%)	
Estadiamento	Precoce (EC I e II)	10 (41,7%)	14 (53,8%)
	Avançado (EC III e IV)	14 (58,3%)	12 (46,2%)

Ao comparar-se hiperexpressão de miRNA-92a e ILV, 61,5% dos pacientes hiperexpressos não apresentaram ILV. Por outro lado, 38,5% dos pacientes apresentaram à análise histopatológica invasão linfovascular ($p= 1,000$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Expressão de miRNA-92a e invasão linfovascular

Variável	EXPRESSÃO miRNA-92a		
	Não Hiper Expresso n(%)	Hiper Expresso n(%)	
ILV	ausente	13 (61,9%)	16 (61,5%)
	presente	8 (38,1%)	10 (38,5%)

Ao comparar-se hiperexpressão de miRNA-92a e sobrevida livre de doença (SLD), 37,5% dos pacientes hiperexpressos apresentaram SLD inferior a 36 meses, enquanto que 62,5% dos pacientes apresentaram SLD igual ou superior a 36 meses ($p= 1,000$) (Tabela 11).

Tabela 11 - expressão de miRNA-92a e sobrevida livre de doença

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-92a	
		Não Hiper Expresso <i>n</i> (%)	Hiper Expresso <i>n</i> (%)
SLD	< 36 meses	7 (41,2%)	9 (37,5%)
	≥ 36 meses	10 (58,8%)	15 (62,5%)

Ao comparar-se hiperexpressão de miRNA-92a e sobrevida global (SG), 26,9% dos pacientes hiperexpressos apresentaram SG inferior a 36 meses e 73,1% apresentaram SG igual ou superior a 36 meses ($p= 0,044$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Expressão de miRNA-92a e sobrevida global

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-92a	
		Não Hiper Expresso <i>n</i> (%)	Hiper Expresso <i>n</i> (%)
SG	< 36 meses	14 (58,3%)	7 (26,9%)
	≥ 36 meses	10 (41,7%)	19 (73,1%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-133a e dosagem sérica de CEA ao diagnóstico, 56,8% dos pacientes hipoexpressos apresentaram CEA < 5, enquanto 43,2% apresentaram CEA ≥ 5 ($p= 0,537$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Expressão de miRNA-133a e dosagem de CEA

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-133a	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
CEA	< 5 ng/dL	21 (56,8%)	6 (46,2%)
	≥ 5 ng/dL	16 (43,2%)	7 (53,8%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-133a e idade, 29,7% dos pacientes hiporexpressos apresentaram idade inferior a 60 anos, ao passo que 70,3% dos pacientes apresentaram idade igual ou superior a 60 anos ($p= 1,000$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Expressão de miRNA-133a e idade

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-133a	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
Idade	< 60 anos	11 (29,7%)	4 (30,8%)
	≥ 60 anos	26 (70,3%)	9 (69,2%)

Ao comparar-se hiporeexpressão de miRNA-133a e estadiamento, 45,9% dos pacientes hiporexpressos foram diagnosticados com doença precoce (estadio clínico I e II), ao passo que 54,1% apresentaram doença avançada ao momento do diagnóstico (estadio clínico III e IV) ($p= 0,751$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Expressão de miRNA-133a e estadiamento

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-133a	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
Estadiamento	Precoce (EC I e II)	17 (45,9%)	7 (53,8%)
	Avançado (EC III e IV)	20 (54,1%)	6 (46,2%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-133a e invasão linfovascular (ILV), 58,8% os pacientes hipoexpressos não apresentaram ILV. Por outro lado, 41,2% dos pacientes apresentaram ILV ($p= 0,739$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Expressão de miRNA-133a e invasão linfovascular

Variável		EXPRESSÃO miRNA-133a	
		Hipo Expresso <i>n</i> (%)	Não Hipo Expresso <i>n</i> (%)
ILV	Ausente	20 (58,8%)	9 (69,2%)
	Presente	14 (41,2%)	4 (30,8%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-133a e sobrevida livre de doença (SLD), 37,9% dos pacientes hipoexpressos apresentaram SLD inferior a 36 meses, enquanto que 62,1% dos pacientes apresentaram SLD igual ou superior a 36 meses ($p= 1,000$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Expressão de miRNA-133a e sobrevida livre de doença

Variável		EXPRESSÃO miRNA-133a	
		Hipo Expresso <i>n</i> (%)	Não Hipo Expresso <i>n</i> (%)
SLD	< 36 meses	11 (37,9%)	5 (41,7%)
	≥ 36 meses	18 (62,1%)	7 (58,3%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-133a e sobrevida global (SG), 45,9% dos pacientes hipoexpressos apresentaram SG inferior a 36 meses, enquanto que 54,1% dos pacientes apresentaram SG igual ou superior a 36 meses ($p= 0,515$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Expressão de miRNA-133a e sobrevida global

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-133a	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
SG	< 36 meses	17 (45,9%)	4 (30,8%)
	≥ 36 meses	20 (54,1%)	9 (69,2%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-145 e CEA, 53,3% dos pacientes hipoexpressos apresentaram dosagem sérica de CEA inferior a 5. Em contrapartida, 46,7% dos pacientes apresentaram CEA igual ou superior a 5 ($p= 1,000$) (Tabela 19).

Tabela 19 - Expressão de miRNA-145 e dosagem de CEA

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-145	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
CEA	< 5 ng/dL	16 (53,3%)	11 (55%)
	≥ 5 ng/dL	14 (46,7%)	9 (45%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-145 e idade, 30% dos pacientes hipoexpressos apresentaram idade inferior a 60 anos, ao passo que 70% dos pacientes apresentaram idade igual ou superior a 60 anos ($p= 1,000$) (Tabela 20).

Tabela 20 - Expressão de miRNA-145 e idade

	Variável	EXPRESSÃO miRNA-145	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
Idade	< 60 anos	9 (30%)	6 (30%)
	≥ 60 anos	21(70%)	14 (70%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-145 e estadiamento, 46,7% dos pacientes hipoexpressos foram diagnosticados ainda em estadio clínico I e II (precoces), enquanto que 53,3% apresentaram doença avançada ao momento do diagnóstico (estadio clínico III e IV) ($p= 1,000$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Expressão de miRNA-145 e estadiamento

Variável		EXPRESSÃO miRNA-145	
		Hipo Expresso <i>n</i> (%)	Não Hipo Expresso <i>n</i> (%)
Estadiamento	Precoce (EC I e II)	14 (46,7%)	10 (50%)
	Avançado (EC III e IV)	16(53,3%)	10 (50%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-145 e ILV, 59,3% dos pacientes hipoexpressos não apresentaram ILV. Por outro lado, 40,7% dos pacientes apresentaram à análise histopatológica invasão linfovascular ($p= 0,767$) (Tabela 22).

Tabela 22 - Expressão de miRNA-145 e invasão linfovascular

Variável		EXPRESSÃO miRNA-145	
		Hipo Expresso <i>n</i> (%)	Não Hipo Expresso <i>n</i> (%)
ILV	Ausente	16 (59,3%)	13 (65%)
	Presente	11 (40,7%)	7 (35%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-145 e sobrevida livre de doença (SLD), 36,4% dos pacientes hipoexpressos apresentaram SLD inferior a 36 meses, enquanto que 63,6% dos pacientes apresentaram SLD igual ou superior a 36 meses ($p= 0,757$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Expressão de miRNA-145 e sobrevida livre de doença

Variável		EXPRESSÃO miRNA-145	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
SLD	< 36 meses	8 (36,4%)	8 (42,1%)
	≥ 36 meses	14 (63,6%)	11 (57,9%)

Ao comparar-se hipoexpressão de miRNA-145 e sobrevida global (SG), metade dos pacientes hipoexpressos apresentaram SG inferior a 36 meses e os outros 50% restantes apresentaram SG igual ou superior a 36 meses ($p= 0,243$) (Tabela 24).

Tabela 24 - Expressão de miRNA-145 e sobrevida global

Variável		EXPRESSÃO miRNA-145	
		Hipo Expresso n(%)	Não Hipo Expresso n(%)
SG	< 36 meses	15 (50%)	6 (30%)
	≥ 36 meses	15 (50%)	14 (70%)

5 DISCUSSÃO

As neoplasias malignas representam a 2ª maior causa de mortalidade em nosso país, perdendo apenas para as doenças do aparelho circulatório. Estima-se, entretanto, que até o ano de 2020 o câncer passe a ocupar a 1ª posição desse ranking (BRASIL, 2016).

Dentre todas as neoplasias malignas, o CCR é o 3º mais incidente entre pacientes do sexo masculino. Já entre as mulheres, é o 2º tumor maligno mais incidente, perdendo apenas para o câncer de mama (BRASIL, 2014).

Apesar de um aumento populacional de 19% na última década observado em nosso meio, no mesmo período foi registrado um aumento de 148% no número de internações e de 102% no número de óbitos por CCR. Diante disso, o desenvolvimento de políticas públicas voltadas para esse grupo de neoplasia torna-se importante. Da mesma maneira, ampliar o conhecimento sobre os tumores colorretais pode representar uma atividade estratégica no enfrentamento da doença (SÃO PAULO (ESTADO), 2016).

O seguimento de pacientes oncológicos é parte de um processo importante do tratamento, em especial tendo em vista o risco de recidiva metacrônica do tumor primário de cólon. Outras questões que podem direcionar um seguimento inicial mais estrito referem-se aos riscos de desenvolvimento de um segundo tumor primário de cólon metacrônico e a posterior confirmação diagnóstica de síndromes genéticas associadas ao CCR (RENEHAN et al., 2002).

Nesse sentido, justifica-se que os pacientes que compõem o grupo de estudo foram operados consecutivamente entre os anos de 2010 e 2011, visando-se obter 5 anos de seguimento. Esse tempo de seguimento foi estipulado visto que o índice de recorrência tumoral nos 5 primeiros anos de seguimento pode chegar a 58% e guarda relação direta entre a chance de recidiva e o estadiamento (que foi uma das variáveis clínico-patológicas pesquisadas) (FIGUEREDO et al., 2003).

Por outro lado, por mais que não esteja muito clara a importância das recidivas após 60 meses, à medida que aumenta o tempo de seguimento há uma queda no índice de recidiva. Esse índice cumulativo entre 5 e 10 anos de seguimento aproxima-se a 5%. Além disso, aparentemente perde-se a influência do estadiamento inicial como fator de risco (BOUVIER et al., 2015).

Independentemente do tempo de seguimento, quando se analisa o câncer colorretal sob ótica de intenção de cura, a ressecção cirúrgica permanece como pedra fundamental do tratamento, mesmo para os pacientes metastáticos ou com lesões localmente avançadas (VIEIRA et al., 2004).

A associação de quimioterapia (Qt) adjuvante àqueles pacientes com metástase linfonodal ou à distância tem sido preconizada visando atingir melhor controle de doença (SHAH et al., 2016).

Ao considerarmos, entretanto, que mesmo pacientes com CCR EC II terão uma taxa de recidiva de até 20%, a indicação mais liberal do tratamento sistêmico passa a ser discutida (BENSON et al., 2004).

Os escores de prognóstico preconizados para selecionar os pacientes que poderiam se beneficiar de Qt adjuvante empregados atualmente apresentam muitas limitações (DIENSTMANN; SALAZAR; TABERNERO, 2015).

Pacientes com doenças de comportamento agressivo, que poderiam ser ajudados pela realização de tratamento complementar, podem acabar não recebendo quimioterapia (PAHLMAN et al., 2016).

Em contrapartida, pacientes com lesões localmente avançadas mas de comportamento indolente, acabam sendo encaminhados para Qt adjuvante e acumulam os efeitos colaterais do tratamento sistêmico sem que seu desfecho seja melhorado (PAHLMAN et al., 2016).

Visando justamente otimizar essa seleção de pacientes, na busca pela oferta de um tratamento oncológico individualizado, que estudos focados em melhorar as ferramentas de predição de prognóstico de portadores de CCR atualmente disponíveis devem ser encorajados.

5.1 Casuística

A idade média, ao diagnóstico, de 66 anos encontrada no grupo de estudo é semelhante àquela observada em países desenvolvidos, porém superior à publicada em países em desenvolvimento como Israel, China e Zimbábue (KATSIDZIRA et al., 2016; SIEGEL et al., 2012; SMIRNOV et al., 2016; YUAN et al., 2013).

Por outro lado, houve uma predominância de pacientes diagnosticados em estádios mais avançados sobre pacientes com doença ainda em estádios iniciais, 52% e 48%, respectivamente. Essa predominância pode estar relacionada a menor acessibilidade dos pacientes a programas de rastreamento de CCR em países em desenvolvimento, bem como à demora decorrida entre o tempo de encaminhamento aos centros de referência e o início do tratamento (COLEMAN, 2010; SIEGEL; DESANTIS; JEMAL, 2014).

O potencial impacto negativo da distância geográfica entre os centros de referência em oncologia e o local de domicílio do paciente foi abordado recentemente em estudo conduzido na Inglaterra. Pacientes que necessitavam viajar maiores distâncias para chegarem aos centros oncológicos demonstraram pior sobrevida após pareadas variáveis como idade, sexo e estadiamento (MURAGE et al., 2016).

Outro aspecto importante em relação ao diagnóstico tardio de pacientes com CCR refere-se à inexistência ou pequena abrangência de programas governamentais de rastreamento da doença no Brasil. Sob essa ótica, os índices baixos de sobrevida observados no continente africano, por exemplo, têm sido, ao menos parcialmente, explicados pelo fato de não haver uma iniciativa ampla que ofereça acesso a colonoscopia de *screening* sequer aos pacientes com alto risco de desenvolver câncer colorretal (LAIYEMO et al., 2016).

O número de linfonodos ressecados também tem sido colocado como um ponto importante ao analisarmos pacientes com CCR operados. Contagem de linfonodos obtidos na peça operatória inferior a 12 tem sido associado a cirurgias tecnicamente inadequadas e a pior prognóstico (GREENE et al., 2001; HOSHINO et al., 2016; TSAI et al., 2016).

Em estudo envolvendo mais de 40 000 pacientes do banco de dados americano SEER, pacientes com EC II que tiveram menos de 12 linfonodos ressecados apresentaram menor sobrevida câncer específica quando comparados a pacientes EC III cujo número de linfonodos ressecados foi maior ou igual a 12 (HUANG et al., 2016).

O papel prognóstico da invasão linfovascular é outro fator que tem sido discutido. Apesar de não ter demonstrado papel prognóstico em nossa casuística, a presença de ILV tem sido associada a piores sobrevida global e sobrevida câncer

específica, bem como fator de risco para recorrência tumoral precoce (PETERSEN et al., 2002).

Ao se analisar pacientes com EC I e II, a presença de ILV representou fator isolado de pior prognóstico, sendo aventado inclusive a utilização da ILV como fator auxiliar na decisão de realização de Qt adjuvante visando à diminuição do índice de recidiva nesses pacientes com tumores precoces, mas de risco elevado (DESOLNEUX et al., 2010).

Especificamente ao se estudar 5000 pacientes com CCR EC II, o grupo que apresentava ILV obteve sobrevida global em 5 anos de 54,6%, ao passo que o grupo de pacientes que não demonstravam ILV tiveram sobrevida global de 69,8% (QUIRKE; MORRIS, 2007).

O discreto predomínio de pacientes do sexo masculino observado na casuística é semelhante ao observado na maioria dos países da América do Sul, América Central e Caribe, com exceção da Bolívia, Guatemala e El Salvador, onde há predomínio feminino (BRAY; PINEROS, 2016).

A taxa de recorrência constatada na série de pacientes em questão está em concordância com a literatura mundial (HUSCHER; BRETAGNOL; CORCIONE, 2015; PARK et al., 2015). Entretanto, à medida que se aumenta o tempo de seguimento desses pacientes, pode haver um aumento no número de casos que apresentam recorrência tumoral sem que isso represente diretamente um comportamento mais agressivo da doença.

Ao analisarmos a sobrevida global e a sobrevida livre de doença observada nesse trabalho, percebemos uma melhor sobrevida de pacientes EC III em relação a pacientes EC II. Esse dado difere daquilo observado tanto em centros fora do Brasil (ANDRE et al., 2015; KUMAR et al., 2015) como de serviços de referência do nosso país (BAIOCCHI et al., 2009; NAHAS et al., 2015).

Um ponto que pode estar relacionado a esse dado é de que os pacientes EC III foram mais comumente encaminhados a tratamento complementar quimioterápico do que pacientes EC II. Assim, a Qt adjuvante poderia ter atuado como viés, uma vez que a quimioterapia pode ter desempenhado atividade citotóxica sobre metástases clinicamente ocultas, diminuindo as taxas de recidiva e aumentando as taxas de sobrevidas livre de doença e global.

Outra questão debatida em relação aos resultados de sobrevida atingidos é o papel de centros de referência na realização de cirurgias oncológicas de grande porte.

Como já previamente demonstrado em neoplasias do trato gastrointestinal alto (ROSA et al., 2014), inclusive em nosso meio, esses centros tendem a demonstrar menores taxas de complicação e tempo de permanência hospitalar (RIBEIRO et al., 2012; DA COSTA et al., 2015).

Em CCR, da mesma maneira, pacientes operados em hospitais distritais apresentam sobrevida global em 5 anos de 48%, enquanto que pacientes submetidos a cirurgia em hospitais altamente especializados apresentam sobrevida global em 5 anos de 71% (CIESIELSKI et al., 2016).

Esses resultados parecem estar mais associados à estrutura física do hospital e à expertise da equipe multidisciplinar envolvida no tratamento do que a características do próprio paciente (KARANICOLAS et al., 2009; LYRATZOPOULOS et al., 2004).

5.2 miRNA e correlações clínico-patológica e prognóstica

A expressão dos miRNAs está alterada em praticamente todos tipos tumorais. Aqueles miRNAs que estão superexpressos nas células neoplásicas e contribuem para a carcinogênese ao inibirem os genes supressores de tumor, são chamados miRNAs oncogênicos (OncomiRs). Em contrapartida, aqueles miRNAs cuja expressão encontra-se diminuída e que habitualmente previnem o surgimento do câncer ao inibir a expressão de protooncogenes, são chamados miRNAs supressores de tumor (DIMOPOULOS; GIMSING; GRONBAEK, 2013; ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006).

Entre os diversos processos celulares controlados pelos miRNA, destacam-se a apoptose, a transição epitélio-mesenquimal, a angiogênese e a sinalização intracelular.

A apoptose apresenta duas vias, uma endógena e outra exógena. A via endógena envolve a participação de proteínas mitocondriais mediadas pelo gene

bcl-2, citocromo C e caspase 9, ativando a via das caspases. Já a via exógena depende da combinação dos receptores transmembrana (FASL, TRAIL e TNFR) e seus ligantes, que ativam a caspase 8, dando início à reação em cadeia que resultará na apoptose (YAN; CAO; MAO, 2015).

No âmbito da atuação dos miRNA como reguladores dos processos celulares, a proteína p53, que desempenha importante função na regulação da apoptose, tem sua função regulada por pelo menos 150 miRNA. A família do miRNA-29, por exemplo, atuando sobre o CDC42, estimula a síntese da proteína p53 e desencadeia a apoptose nas células tumorais (XI et al., 2006).

O mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) é uma etapa crítica que acontece precocemente nos processos de invasão e metastatização. O EMT consiste na reprogramação molecular e mudança no fenótipo celular pela conversão da polarização de células imóveis epiteliais em células móveis mesenquimais (ACLOQUE; THIERY; NIETO, 2008; CHOUAIB et al., 2002).

Nesse processo, o fator de crescimento transformador beta (TGF β), ao induzir o aumento da expressão da vimentina e reduzir a expressão da E-caderina, estimula o processo de EMT e facilita a liberação da célula em relação ao tumor, permitindo que ela atinja a circulação (ZHANG; LI; LAI, 2010).

Ao estudarem culturas celulares de câncer de mama, Gregory et al. (2008) identificaram que a família do miRNA-200 atua na regulação da EMT. O miRNA-200, ao se ligar ao complexo RISC, inibe a produção dos *zinc finger E-box-binding homeobox 1 e 2* (ZEB 1 e ZEB 2). As moléculas ZEB 1 e ZEB 2, que inibiriam a síntese da E-caderina, por sofrerem um bloqueio em sua produção, culminam em aumentar a expressão da E-caderina. Ao final dessa cascata, a E-caderina aumenta a síntese das chamadas *tight junctions* e inibe o processo de EMT (GREGORY et al., 2008).

Entre os miRNA envolvidos no processo de EMT no CCR, o miRNA-21 parece desempenhar uma importante função ao inibir a expressão da E-caderina e estimular a expressão de marcadores mesenquimais como a vimentina e a *snail-1*. Entretanto, como outros estudos não têm corroborado a função de supressão da E-caderina pelo miRNA-21, não está claro se a participação desse miRNA no CCR pode sofrer influências genéticas e geográficas (JACA et al., 2016).

A angiogênese, outro crítico processo para o crescimento tumoral, apresenta participação preponderante do fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF) e do

fator induzido pela hipóxia (HIF-1). Na ocorrência de hipóxia no microambiente celular, o HIF-1 é liberado e por sua vez atua sobre o VEGF, estimulando a neoangiogênese e restaurando a irrigação do tumor permitindo assim que este continue seu processo de multiplicação, crescimento e invasão (YAN; CAO; MAO, 2015).

O miRNA-22, hipoexpresso em células de tumor de cólon e hiperexpresso em tecido colônico sadio, atua sobre o HIF-1a. Prova disso é o fato de que células de tumor de cólon que não expressam o miRNA-22 apresentam um aumento de expressão do HIF-1a e consequente hiperexpressão do VEGF (YAMAKUCHI et al., 2011).

Por outro lado, o miRNA-619 é hiperexpresso em amostras de CCR, sofrendo estímulo positivo pela ação do VEGF e criando uma alça de retro-alimentação. Esse mecanismo confere um continuado estímulo à angiogênese (DUMOUTIER et al., 2001).

No caso da sinalização intracelular, o miRNA-143 apresenta um papel determinante. Hipoexpresso em amostras tumorais quando comparado a amostras de tecido não neoplásico, quando adiciona-se um precursor desse miRNA a culturas de células tumorais de cólon, ocorre um bloqueio do desenvolvimento tumoral através de inibição da via do gene *KRAS* (AKAO; NAKAGAWA; NAOE, 2006).

A via PIK3/AKT também é regulada pela ação de miRNA. Importante para a sobrevivência e migração de células tumorais, essa via é hiperativada quando adiciona-se um precursor de miRNA-196 a culturas celulares de CCR, sugerindo um potencial de aplicação do miRNA-196 no tratamento de pacientes portadores de neoplasia maligna colorretal (YAN; CAO; MAO, 2015).

Em estudo com modelos murinos de desenvolvimento de câncer de cólon a partir de colite induzida experimentalmente, o miRNA-155 esteve hiperexpresso no tecido tumoral comparado ao tecido colônico sadio adjacente. Além disso, a deleção do miRNA-155 esteve associada ao surgimento de maior número de lesões polipóides colônicas, bem como a uma maior taxa de displasia de alto grau e de mortalidade (VELAZQUEZ et al., 2016).

Por outro lado, miRNA-1 e miRNA-145 demonstraram capacidade de inibir a sobrevivência de culturas de células de tumores colônicos ao atuarem sobre o mesmo gene alvo, a proteína inibidora de apoptose da família NLR. Assim, agentes terapêuticos alvo que aumentassem a quantidade miRNA-1 e miRNA-145 ou os mimetizassem poderiam desempenhar um papel potencial no tratamento do CCR (XU et al., 2015).

O miRNA-34a, por sua vez, apresenta-se hipoexpresso em amostras tumorais quando comparado a amostras de tecido colônico não neoplásico. Através do receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas, o miRNA-34a inibe a proliferação celular, induz a persistência da célula na fase G1, suprime a metastatização e a transição epitélio mesenquimal (LI et al., 2015).

Até mesmo a resistência a quimioterápicos desenvolvida por neoplasias malignas após transcorrido algum ciclo de tratamento sistêmico ou intrinsecamente demonstrada no momento do início da quimioterapia tem sido associada à atuação de miRNA.

Em estudo envolvendo culturas de células de câncer gástrico da linhagem parental SGC 7901, a indução de hiperexpressão do miRNA-106a levou à resistência à cisplatina, um quimioterápico bastante utilizado no cenário clínico para o tratamento quimioterápico de pacientes portadores de câncer de estômago. Nesse mesmo estudo, a hipoexpressão do miRNA-106a esteve associada a uma maior citotoxicidade causada pela exposição à cisplatina. O mecanismo dessa resistência envolve a participação da proteína *phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10* (PTEN) e a inibição da via da quinase fosfatidilinositol 3 (PIK3)/proteinoquinase B (AKT) (FANG et al., 2013).

Ao analisarem a linhagem celular SGC 7901 quimiorresistente buscando investigar o papel dos miRNA-15b e miRNA-16, Xia et al. (2008) perceberam que a hiperexpressão desses miRNA inibiria a expressão do gene *BCL2*. O gene *bcl-2*, por sua vez, ao ser inibido, perderia a capacidade de inibir a apoptose e tornaria a linhagem SGC 7901 quimiorresistente em quimiosensível. Assim, esses miRNA representariam um potencial importante no mecanismo de quimiorresistência dos tumores gástricos (XIA et al., 2008).

Assim, a comprovação de que as moléculas de miRNA desempenham papel importante no mecanismo de quimiorresistência demonstrado por tumores gástricos figurou com um dos mais importantes avanços em oncologia do trato gastrointestinal alto nos últimos 25 anos (FAN et al., 2005).

O papel dos miRNA em câncer de mama também têm sido estudado. O miRNA-21, um OncoMir, é hiperexpresso em amostras de tecido tumoral de mama quando comparado a amostras de tecido mamário não-neoplásicas. Em culturas celulares da linhagem MCF-7 e em modelos de xeno-enxerto, foram documentados o aumento da apoptose e diminuição da proliferação celular através da utilização de

oligonucleotídeos anti-miRNA-21. Esse resultado corrobora a hipótese da função anti-apoptótica do gene *bcl-2* (SI et al., 2007).

O gene *ATP-binding cassette member 5 (ABCB5)* também atua como mediador de quimiorresistência. Em pacientes portadores de carcinoma de células de Merckel, um agressivo tumor neuroendócrino primário da pele, e que desenvolveram resistência à carboplatina e ao etoposídeo, a expressão do ABCB5 aumentou significativamente ao compararmos biópsias teciduais antes e após instituído o tratamento quimioterápico (KLEFFEL et al., 2016).

Apesar dos mecanismos de quimiorresistência apresentarem inúmeras semelhanças entre diferentes neoplasias, o melanoma talvez seja o tipo de neoplasia que demonstra características específicas nesse processo, seja por possuir vesículas intracelulares, chamadas melanosomas, responsáveis por aprisionar e exportar os agentes quimioterápicos, seja por diminuir a concentração intracelular da droga através dos transportadores da família ABC. Além disso, esses mecanismos não estão restritos à resistência de um único quimioterápico. Tanto a dacarbazina como os agentes, tipo a temozolamida e o vemurafenib apresentam queda em sua eficácia ao longo do tratamento, e este processo é mediado principalmente pelo gene *ABCB5* (CHARTRAIN et al., 2012).

Em tumores hepáticos, a existência de hiperexpressão do gene *ABCB5* e a elevada quantificação da proteína fetal precursora granulina-epitelina têm sido associada a maior potencial de desenvolvimento de células tronco tumorais e pior sobrevida livre de recorrência (CHEUNG et al., 2011, 2016).

Em câncer de cólon também foi identificada a participação dos miRNA no mecanismo de quimiorresistência. Em estudo conduzido com linhagens de células de tumor de cólon, os clones resistentes à doxorrubicina apresentaram hipoexpressão de miRNA-522 quando comparados ao controle. A participação do miRNA-522 no mecanismo de quimiorresistência também envolve a inibição da tradução do RNAm do gene *ABCB5* (YANG et al., 2015).

Marcadores genéticos capazes de prever o comportamento tumoral e o prognóstico do paciente, independente do estadiamento da doença, e assim direcionar a escolha de uma abordagem terapêutica individualizada, são constantemente pesquisados.

Essa busca justifica-se pelo fato de que esses marcadores possam representar a consolidação na prática clínica dos conhecimentos oriundos das

alterações genéticas e epigenéticas associadas ao CCR (CARETHERS; JUNG, 2015).

5.2.1 miRNA-92a

O miRNA-92a é um membro do complexo oncogênico miRNA-17-92, o qual consiste em 6 microRNA co-expressos, a saber: miRNA-17, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-19b, miRNA-20 e miRNA-92a.

Esse complexo oncogênico é hiperexpresso em tumores do sistema nervoso central, linfomas de células B, câncer de pulmão e linfomas de Burkitt (OLIVE; JIANG; HE, 2010; SCHULTE et al., 2008).

A hiperexpressão do miRNA-92a apresentou uma tendência à associação com estadios precoces e menores valores de CEA. Esse resultado diverge do que foi publicado por Zhou et al. (2013), onde ao avaliarem 82 pacientes com câncer de cólon e reto os autores observaram uma relação entre a hiperexpressão de miRNA-92a e doença com estágio clínico avançado.

Ainda nesse sentido, Tsuchida et al. (2011), ao demonstrarem que a inserção de anti-miRNA-92a a culturas estimulou a ocorrência de apoptose, comprovaram um papel determinante desse miRNA no mecanismo de resistência ou escape à apoptose de células de CCR.

Em tumores de bexiga, o miRNA-92a esteve hipoexpresso em tumores não-músculo invasivos, ao passo que tumores músculo invasivos demonstraram hiper ou normo-expressão desse miRNA. Além disso, a hiperexpressão (valores maior ou igual a três vezes o valor médio do Fold) do miRNA-92a foi associada a pior sobrevida global quando comparada aos pacientes hipoexpressos (valores menor ou igual a 1/3 do valor médio do Fold) (PIGNOT et al., 2012).

Em melanoma, o miRNA-92a também foi identificado como hiperexpresso em linhagens celulares tumorais quando comparados a linhagens de células melanocíticas, porém não foi demonstrada nenhuma relação do miRNA com desfechos clínicos (LEVATI et al., 2009).

Em tumores de ovário de linhagem epitelial, a dosagem sérica de miRNA-92a também demonstrou hiperexpressão no grupo de estudo quando comparado a

pacientes hígidos que compunham o grupo controle. Novamente, a hiperexpressão desse OncoMir esteve associada a doença em estágio avançado e metástase linfonodal, porém não demonstrou relação com a idade ao diagnóstico (GUO et al., 2013).

Em neuroblastomas, o miRNA-92a demonstrou capacidade de inibir a proteína Dickkopf-3 (DKK3) supressora de tumor. Assim, em lesões em que havia hiperexpressão do miRNA-92a, ocorria um estímulo ao crescimento do tumor e uma relação com sua agressividade (HAUG et al., 2011; KE et al., 2015).

Além disso, a hiperexpressão do miRNA-92a esteve associada a maior SG com significância estatística. Esse resultado abre uma linha de raciocínio à investigação da relação de fatores geográfico e genético sobre a expressão do miRNA-92a, uma vez que a hiperexpressão desse miRNA havia sido previamente associada a menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença (KE et al., 2015).

Da mesma maneira, como as pesquisas envolvendo miRNA-92a ainda são iniciais, a ocorrência de resultados conflitantes faz parte do amadurecimento do tema.

Ao mesmo tempo, esses resultados conflitantes reiteram a necessidade de estudos subsequentes visando o pleno esclarecimento das dúvidas a respeito da participação desse miRNA na tumorigênese e sua relação com as diversas variáveis clínico-patológicas e os desfechos oncológicos.

5.2.2 miRNA-133a

Apesar do papel específico e da exata função do miRNA-133a ainda não estarem claros, tem se verificado a hipoexpressão desse miRNA em tecidos tumorais de pulmão não-pequenas células, gastrointestinais, osteossarcoma e de ovário quando comparado a tecidos não neoplásicos (FUJIWARA et al., 2014; GUO et al., 2014; QIU et al., 2014; WANG et al., 2014).

A Fascin1 (FSCN1), uma proteína ligadora que está associada aos processos de invasão e motilidade celulares, e é inibida pelo miRNA-133a. Dessa maneira, em culturas celulares em que a quantidade do miRNA-133a é aumentada, a FSCN1 é inibida e há uma inibição da invasão celular em CCR (ZHENG et al., 2015).

Outra proteína com função pró-tumoral e que é inibida pelo miRNA-133a é o fator de crescimento derivado da insulina-1 (IGF-1), que promove a proliferação celular e a formação de colônias de células em tumores de ovário (GUO et al., 2014).

A hipoexpressão do miRNA-133a apresentou tendência à relação com estágio avançado, baixo nível de CEA e menor SG. Apesar de não terem sido encontrados trabalhos relacionando o miRNA-113a e variáveis clínicas, a partir do fato de que o miRNA-133a aparentemente inibe a expressão de proteínas com função pró-tumoral, pode-se postular que o miRNA-133a representa um alvo potencial para o tratamento do CCR.

A hipoexpressão desse miRNA estatisticamente significativa em pacientes do grupo de estudo quando comparado ao grupo controle está em concordância com a literatura (WU et al., 2012; DONG et al., 2013).

Em tumores de esôfago, a capacidade de dosagem de miRNA-133a no plasma servir no diagnóstico foi comprovada. Ao se analisar pacientes com esôfago de Barret, pacientes controle hígidos e pacientes com adenocarcinoma de esôfago, o miRNA-133a demonstrou-se hipoexpresso no grupo de pacientes com neoplasia maligna invasora comparada aos demais grupos de pacientes (BUS et al., 2016).

Em tumores neuroendócrinos primários do pâncreas e do íleo, a expressão do miRNA-133a é significativamente inferior em amostras de tecido tumoral metastático ao compararmos com amostras do tecido tumoral primário. Essa diferença de expressão pode estar associada a um acúmulo de mutações no tecido metastático que conseguiu se desprender do tumor primário e realizar o processo de disseminação quando comparado ao tecido do tumor primário que não demonstrou a capacidade de disseminar-se (SPERVESLAGE et al., 2014).

Em câncer de mama, a injeção de miRNA-133a exógeno no sangue de modelos experimentais de xenoenxerto sob o auxílio de microbolhas levou à redução do tamanho do tumor. Esse resultado pode estar associado à inibição do crescimento tumoral gerada pelo miRNA-133a a partir da inibição do receptor do fator de crescimento derivado do endotélio (EGFR) (JI et al., 2016).

Por outro lado, o miRNA-133a já teve sua hiperexpressão associada a pior prognóstico. Esse paradoxo pode ser parcialmente explicado pela desregulação na expressão dos genes alvo do miRNA-133a (WAN et al., 2014).

5.2.3 miRNA-145

Dentre os miRNA abordados nesse trabalho, o miRNA-145 é aquele que mais dispõe de dados publicados até o momento da redação dessa tese.

Conforme abordado nos resultados, o miRNA-145 demonstrou apenas tendência entre a associação de hipoexpressão e menor SG. Podemos aventar que tal relação poderia ser demonstrada de maneira mais clara se a casuística fosse maior.

O miRNA-145, ao inibir o gene *PAK4*, inibe a via oncogênica MAPK e leva assim à inibição do crescimento tumoral. Essa comprovação foi obtida em estudo experimental utilizando culturas de células da linhagem SW620, durante o qual células que foram suplementadas com miRNA-145 demonstraram uma atenuação no crescimento tumoral (LI et al., 2016; WANG et al., 2012).

Em estudos prévios, o papel do miRNA-145 no diagnóstico precoce, no manejo terapêutico e na identificação de prognóstico demonstrou resultados promissores.

Com o auxílio de nanotecnologia, células de tumores de pâncreas às quais foram adicionadas partículas contendo miRNA-145, apresentaram menor capacidade de multiplicação, migração e invasão. Esse dado, por exemplo, demonstra a possibilidade de aplicação do miRNA-145 como potencial alvo no tratamento de pacientes oncológicos (SETUA et al., 2016).

O miRNA-145, assim como o miRNA-378*, demonstrou ainda ter capacidade de diferenciar amostras de neoplasias malignas de câncer de cólon de amostras de tecido colônico sadio pareadas dos mesmos pacientes (PENG et al., 2015).

Estudos posteriores abordando também pólipos adenomatosos colônicos com displasia poderão responder sobre a utilidade da quantificação de miRNA-145 na diferenciação de lesões pré-malignas e tumores invasivos, quando houver dúvida na diferenciação desses dois grupos de lesões a partir do aspecto endoscópico e do estudo anatomopatológico.

Em estudo conduzido com amostras de tecido tumoral colônico de pacientes EC II e III, ao contrário, a hiperexpressão do miRNA-145 esteve associada à maior taxa de metástase linfonodal, apesar do miRNA-145 estar hipoexpresso no tecido tumoral primário nos dois grupos. Essa relação entre a hiperexpressão do miRNA-145 e a incidência de metástase linfonodal pode significar a participação desse

miRNA na disseminação tumoral e no processo de transição epitélio-mesenquimal (YUAN et al., 2014).

Em estudo envolvendo 226 pacientes portadores de adenocarcinoma de pulmão EC II e III, níveis elevados de miRNA-145 estiveram associados a melhores sobrevida global e sobrevida livre de progressão. Além disso, pacientes com hiperexpressão do miRNA-145 apresentaram 74,1% de taxa de resposta ao uso de Erlonitinib, ao passo que pacientes que não demonstraram hiperexpressão desse miRNA obtiveram taxa de resposta de 42,6%. Essa disparidade significa um grande avanço no manejo de tumores de pulmão, ao demonstrar a capacidade da dosagem de miRNA-145 predizer a resposta ao tratamento sistêmico (YAN et al., 2014).

Em estudos com culturas de células de tumores de colo de útero, a inserção de plasmídios recombinantes de miRNA-145 em células que não apresentavam a expressão desse miRNA levaram à inibição da multiplicação dessas células, em um processo mediado pela supressão da proteína quinase-6 dependente de ciclina (ZHANG, J. et al., 2014).

Já em amostras de tumores de colo de útero, a hipoexpressão de miRNA-145 esteve associada a doença avançada, metástase linfonodal, ILV e menor sobrevida global. Além disso, hipoexpressão do miRNA-145 e hiperexpressão do oncomiR-9 foram fatores independentes para pior SG à análise multivariada (AZIZMOHAMMADI et al., 2016).

Em nosso meio, estudo conduzido com 35 amostras de tumores de cavidade oral e orofaringe e 10 amostras de tecido sadio com miRNAs associados ao controle de células tronco tumorais, considerou amostras com valores maiores que duas vezes a média do grupo controle como hiperexpressos para miRNA-145. Nesse estudo, a hiperexpressão do miRNA-145 foi associada com a presença de ILV porém não apresentou correlação com desfechos oncológicos (BRITO et al., 2016).

Em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de esôfago, a expressão tecidual do miRNA-145 também mostrou-se significativamente inferior nas amostras tumorais quando comparada a amostras de tecido esofágico sadio adjacente. Novamente, porém, essa hiperexpressão não esteve associada aparentemente a melhores desfechos (HARADA et al., 2015).

Já em câncer de próstata, tanto em culturas de células quanto em amostras tumorais *in vitro*, o miRNA-145 esteve associado à regulação do crescimento tumoral. Apesar de não ter avaliado desfechos clínicos, ficou claro que a adição de

miRNA-145 a culturas de células interrompe o processo de crescimento tumoral, sugerindo que esse miRNA apresenta importante função na regulação do crescimento tumoral em câncer de próstata ao inibir a protease *small ubiquitin-like modifier-specific protease 1* (SEN1) (WANG, C. et al., 2015).

O miRNA-145 também foi associado ao complexo mecanismo de controle das células tronco tumorais. Em estudo envolvendo culturas de células tronco tumorais de sarcoma de Ewing pediátrico, o miRNA-145 e o gene *EWS-FLI-1* atuaram inibindo o gene *SOX-2*, bloqueando tanto o crescimento celular quanto o processo de tumorigênese (RIGGI et al., 2010).

Quando avaliada sua expressão em 166 pacientes portadores de osteossarcoma, o miRNA-145 mostrou-se hipoexpresso nas amostras tumorais quando comparada a amostras pareadas de tecido ósseo não-neoplásico. Essa hipoexpressão também demonstrou estar associada a doença avançada ao diagnóstico, pior sobrevida global e pior sobrevida livre de doença (TANG et al., 2013).

O miRNA-145 também apresentou resultados promissores no tratamento de pacientes portadores de tumor de pulmão não-pequenas células (NSCLC). Em estudos com culturas de células de NSCLC, a transfecção de plasmídios com miRNA-145 resultou em inibição do crescimento tumoral e efeito sinérgico quando associado ao tratamento radioterápico, demonstrando um potencial de aplicabilidade clínica para a viroterapia oncolítica (CHEN et al., 2010; LI et al., 2013).

Devido a esses resultados, inclusive, que uma meta-análise sobre a utilidade da dosagem do miRNA-145 no diagnóstico de neoplasias foi conduzido. Nesse trabalho, a dosagem sérica do miRNA-145 demonstrou sensibilidade e especificidade de 71% e 75%, respectivamente, no diagnóstico de pacientes com neoplasia. O mesmo trabalho, inclusive demonstrou que essa capacidade de diferenciação de pacientes hígidos e pacientes portadores de neoplasia é ainda maior em pacientes caucasianos (HOU et al., 2015).

5.3 Considerações finais

Identificar fatores preditores de prognóstico em pacientes com CCR apresenta função estratégica, ao permitir a racionalização de recursos aplicados a exames de

seguimento e tratamentos adjuvantes. Além disso, estes marcadores podem oferecer subsídio à tomada de decisões clínicas que otimizem os finitos recursos disponíveis à saúde.

Por sua vez, ao gerar informações que ofereçam alguma luz às dúvidas mais frequentes dos pacientes, como suas chances de cura e de recidiva, os fatores capazes de predizer o prognóstico podem também auxiliar no tratamento oncológico.

A identificação de perfis moleculares associados a comportamentos tumorais distintos, decorrentes dos diferentes padrões de expressão de miRNA, surge como uma ferramenta potencial acurada na seleção desses pacientes.

Sob essa ótica, pacientes portadores de tumor de cólon cujo perfil de expressão de miRNA seja associado a comportamento agressivo teriam seu seguimento oncológico mais rigoroso, e até mesmo o encaminhamento para tratamento adjuvante poderia ser discutido.

Por outro lado, seria possível ainda oferecer um seguimento clínico um pouco mais espaçado àqueles pacientes cujo perfil de expressão de miRNA pelo tumor é associado a comportamento indolente e, eventualmente, poupá-los da toxicidade de um tratamento complementar que sabidamente não traria benefícios.

Os estudos referentes ao papel desempenhado pelos miRNA no câncer de cólon, apesar de promissores, ainda carecem de universalidade em relação aos valores de referência utilizados para classificá-los como hipo ou hiperexpressos.

Essa carência limita a aplicabilidade clínica dos miRNA no cotidiano de pacientes oncológicos, restando por hora a utilização dos miRNA no cenário de pesquisa.

A realização de estudos posteriores que validem os diferentes perfis de miRNA e seu respectivo prognóstico poderá ser importante para a aplicabilidade clínica.

6 CONCLUSÃO

O miRNA-133a apresentou hipoexpressão tecidual no grupo de estudo quando comparado ao grupo controle, ao passo que os miRNA-92a e miRNA-145 não apresentaram diferença de expressão.

A expressão do miRNA-92a, miRNA-133a e miRNA-145 não demonstrou associação com as variáveis clínico-patológicas (valor de CEA pré-tratamento, estadiamento TNM, presença de invasão linfovascular e idade ao diagnóstico).

A hiperexpressão do miRNA-92a esteve associada a maior sobrevida global, sugerindo um potencial de utilização desse miRNA como marcador prognóstico.

7 REFERÊNCIAS

ACLOQUE, H.; THIERY, J. P.; NIETO, M. A. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. **EMBO Rep.**, London, v. 9, n. 4, p. 322-6, Apr. 2008.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, n. 9, p. 1324-37, Feb. 2007.

AGUIAR, S., JR. et al. Prognostic and predictive value of the thymidylate synthase expression in patients with non-metastatic colorectal cancer. **Eur. J. Surg. Oncol.**, London, v. 31, n. 8, p. 863-8, Oct. 2005.

AHMED, S. et al. Advances in the management of colorectal cancer: from biology to treatment. **Int. J. Colorectal Dis.**, Heidelberg, v. 29, n. 9, p. 1031-42, Sep. 2014.

AHN, J. B. et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. **Cancer**, New York, v. 117, n. 9, p. 1847-54, May 2011.

AKAO, Y.; NAKAGAWA, Y.; NAOE, T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. **Oncol. Rep.**, Athens, v. 16, n. 4, p. 845-50, Oct. 2006.

ALLEGRA, C. J. et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 29, n. 1, p. 11-6, Jan. 2011.

ALMEIDA, A. L. et al. Serological under expression of microRNA-21, microRNA-34a and microRNA-126 in colorectal cancer. **Acta Cir. Bras.**, Sao Paulo, v. 31, p. 13-8, 2016. Supplement 1.

AMIRKHAH, R. et al. MicroRNA-mRNA interactions in colorectal cancer and their role in tumor progression. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 54, n. 3, p. 129-41, Mar. 2015.

ANDERSEN, H. S. et al. The pathological phenotype of colon cancer with microsatellite instability. **Dan. Med. J.**, Copenhagen, v. 63, n. 2, p. A5198, Feb. 2016.

ANDRE, T. et al. Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 25, n. 24, p. 3732-8, Aug. 2007.

ANDRE, T. et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 33, n. 35, p. 4176-87, Dec. 2015.

ANDREYEV, H. J. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 90, n. 9, p. 675-84, May 1998.

_____. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. **Br. J. Cancer**, London, v. 85, n. 5, p. 692-6, Sep. 2001.

AZIZMOHAMMADI, S. et al. Molecular identification of miR-145 and miR-9 expression level as prognostic biomarkers for early-stage cervical cancer detection. **QJM**, Oxford, Jun. 2016. In press.

BAIOCCHI, G. et al. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. **Int. J. Colorectal Dis.**, Heidelberg, v. 24, n. 9, p. 1059-68, Sep. 2009.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan. 2004.

BENSON, A. B., 3rd, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 22, n. 16, p. 3408-19, Aug. 2004.

BERNARDES, M. V. et al. Comparative evaluation of oncologic outcomes in colon cancer. **Acta Cir. Bras.**, Sao Paulo, v. 31, p. 34-9, 2016. Supplement 1.

BERTAGNOLLI, M. M. et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer--a study of CALGB 9581 and 89803. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 29, n. 23, p. 3153-62, Aug. 2011.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, Woodbury, v. 1, n. 6, p. a003129, Dec. 2009.

BETTONI, F. et al. Intratumoral genetic heterogeneity in rectal cancer: are single biopsies representative of the entirety of the tumor? **Ann. Surg.**, Philadelphia, Jul. 2016. In press.

BISHOP, J. M.; WEINBERG, R. A. **Molecular oncology**. New York: Scientific American, 1996.

BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 6, n. 8, p. 611-22, Aug. 2005.

BOKEMEYER, C. et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 1466-75, Jul. 2012.

BOLAND, C. R. et al. 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 Res.**, Baltimore, v. 58, n. 22, p. 5248-57, Nov. 1998.

BOTCHKINA, I. L. et al. Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. **Cancer Genomics Proteomics**, Kapandriti, v. 6, n. 1, p. 19-29, Jan.-Feb. 2009.

BOUVIER, A. M. et al. Incidence and patterns of late recurrences in colon cancer patients. **Int. J. Cancer**, New York, v. 137, n. 9, p. 2133-8, Nov. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Morbidade Hospitalar do SUS**. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 23/11/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Mortalidade**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/mortalidade>>. Acesso em: 23/11/2016.

BRATTAIN, M. G. et al. Heterogeneity of human colon carcinoma. **Cancer Metastasis Rev.**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 177-91, 1984.

BRAY, F.; PINEROS, M. Cancer patterns, trends and projections in Latin America and the Caribbean: a global context. **Salud Publica Mex.**, Mexico, v. 58, n. 2, p. 104-17, Apr. 2016.

BRITO, B. L. et al. Expression of stem cell-regulating miRNAs in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 647-654, Oct. 2016.

BUDINSKA, E. et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. **J. Pathol.**, London, v. 231, n. 1, p. 63-76, Sep. 2013.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 8, n. 9, p. 671-82, Sep. 2008.

BUS, P. et al. Profiling of circulating microRNAs in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. **J. Gastroenterol.**, Tokyo, v. 51, n. 6, p. 560-70, Jun. 2016.

CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 149, n. 5, p. 1177-1190.e3, Oct. 2015.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 4, n. 2, p. 118-32, Feb. 2004.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 2, n. 8, p. 563-72, Aug. 2002.

CHARTRAIN, M. et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e36762, 2012.

CHEN, Z. et al. miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, London, v. 29, p. 151, 2010.

CHEN, Z. L. et al. microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin. **J. Biol. Chem.**, Berlin, v. 286, n. 12, p. 10725-34, Mar. 2011.

CHEUNG, P. F. et al. Hepatic cancer stem cell marker granulin-epithelin precursor and β -catenin expression associate with recurrence in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, Albany, v. 7, p. 21644-57, 2016.

CHEUNG, S. T. et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 140, n. 1, p. 344-55, Jan. 2011.

CHO, K. R.; VOGELSTEIN, B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. **Cancer**, New York, v. 70, n. 6, p. 1727-31, Sep. 1992a. Supplement.

CHO, K. R.; VOGELSTEIN, B. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, New York, v. 16g, p. 137-41, 1992b.

CHOUAIB, S. et al. Tumor escape from killing: role of killer inhibitory receptors and acquisition of tumor resistance to cell death. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 273-81, Oct. 2002.

CIESIELSKI, P. et al. Assessment of the surgical treatment results in patients with colorectal cancer in a district hospital versus treatment results in a highly specialized center. **Pol. Przegl. Chir.**, Warszawa, v. 88, n. 4, p. 188-95, Sep. 2016.

COHEN, S. A. et al. Evaluation of CpG island methylator phenotype as a biomarker in colorectal cancer treated with adjuvant oxaliplatin. **Clin. Colorectal Cancer**, Dallas, v. 15, n. 2, p. 164-9, Jun. 2016.

COLEMAN, M. P. Cancer survival in the developing world. **Lancet Oncol.**, London, v. 11, n. 2, p. 110-1, 2010.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 1073-81, Jul. 2009.

DA COSTA, W. L., JR. et al. Total gastrectomy for gastric cancer: an analysis of postoperative and long-term outcomes through time: results of 413 consecutive cases in a single cancer center. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 22, n. 3, p. 750-7, Mar. 2015.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 949-54, Jun. 2002.

DE SOUSA, E. M. F. et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. **Nat. Med.**, New York, v. 19, n. 5, p. 614-8, May 2013.

DESHPANDE, A.; SICINSKI, P.; HINDS, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene**, Basingstoke, v. 24, n. 17, p. 2909-15, Apr. 2005.

DESOLNEUX, G. et al. Prognostic factors in node-negative colorectal cancer: a retrospective study from a prospective database. **Int. J. Colorectal Dis.**, Heidelberg, v. 25, n. 7, p. 829-34, Jul. 2010.

DEVITA, V. T., JR.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

DIENSTMANN, R.; SALAZAR, R.; TABERNERO, J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 33, n. 16, p. 1787-96, Jun. 2015.

DIMOPOULOS, K.; GIMSING, P.; GRONBAEK, K. Aberrant microRNA expression in multiple myeloma. **Eur. J. Haematol.**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 95-105, Aug. 2013.

DONG, Y. et al. Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer. **Mol. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 11, n. 9, p. 1051-60, Sep. 2013.

DUMOUTIER, L. et al. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 167, n. 7, p. 3545-9, Oct. 2001.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 6, n. 4, p. 259-69, Apr. 2006.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, New York, v. 281, n. 5381, p. 1317-22, Aug. 1998.

FAN, D. et al. Bird's-eye view on gastric cancer research of the past 25 years. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Melbourne, v. 20, n. 3, p. 360-5, 2005.

FANG, Y. et al. miR-106a confers cisplatin resistance by regulating PTEN/Akt pathway in gastric cancer cells. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, Shanghai, v. 45, n. 11, p. 963-72, Nov. 2013.

FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu. Rev. Pathol.**, Palo Alto, v. 6, p. 479-507, 2011.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun. 1990.

FIGUEREDO, A. et al. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. **BMC Cancer**, London, v. 3, p. 26, Oct. 2003.

FRATTINI, M. et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 10, n. 12 Pt 1, p. 4015-21, Jun. 2004.

FUJIWARA, T. et al. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. **Stem Cells**, Basel, v. 32, n. 4, p. 959-73, Apr. 2014.

GALLOIS, C.; LAURENT-PUIG, P.; TAIEB, J. Methylator phenotype in colorectal cancer: a prognostic factor or not? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Boca Raton, v. 99, p. 74-80, Mar. 2016.

GREENE, F. L. et al. **AJCC cancer staging manual**. 6th ed. New York: Springer, 2001.

GREGORY, P. A. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nat. Cell Biol.**, London, v. 10, n. 5, p. 593-601, May 2008.

GUO, F. et al. Serum microRNA-92 expression in patients with ovarian epithelial carcinoma. **J. Int. Med. Res.**, London, v. 41, n. 5, p. 1456-61, Oct. 2013.

GUO, J. et al. miR-133a suppresses ovarian cancer cell proliferation by directly targeting insulin-like growth factor 1 receptor. **Tumour Biol.**, Tokyo, v. 35, n. 2, p. 1557-64, Feb. 2014.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 86, n. 3, p. 353-64, Aug. 1996.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar. 2011.

HARADA, K. et al. Suppressor microRNA-145 is epigenetically regulated by promoter hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.**, Attiki, v. 35, n. 9, p. 4617-24, Sep. 2015.

HAUG, B. H. et al. MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 1005-12, Jul. 2011.

HERZIG, D. O.; TSIKITIS, V. L. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. **J. Surg. Oncol.**, New York, v. 111, n. 1, p. 96-102, Jan. 2015.

HILL, M. J.; MORSON, B. C.; BUSSEY, H. J. Aetiology of adenoma--carcinoma sequence in large bowel. **Lancet**, London, v. 1, n. 8058, p. 245-7, Feb. 1978.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, London, v. 411, n. 6835, p. 366-74, May 2001.

HOSHINO, N. et al. Impact of age on the prognostic value of number of lymph nodes retrieved in patients with stage II colorectal cancer. **Int. J. Colorectal Dis.**, Heidelberg, v. 31, n. 7, p. 1307-13, Jul. 2016.

HOU, Y. et al. MicroRNA-145 as ideal biomarker for the diagnosis of various carcinomas. **Tumour Biol.**, Tokyo, v. 36, n. 4, p. 2641-9, Apr. 2015.

HUANG, B. et al. Heterogeneous survival between stage IIA and stage IIIA colon cancer when different numbers of lymph nodes are harvested. **ANZ J. Surg.**, Carlton, Aug. 2016. In press.

HUMPHRIES, A. et al. Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 110, n. 27, p. E2490-9, Jul. 2013.

HUSCHER, C. G.; BRETAGNOL, F.; CORCIONE, F. Laparoscopic colorectal cancer resection in high-volume surgical centers: long-term outcomes from the LAPCOLON Group Trial. **World J. Surg.**, London, v. 39, n. 8, p. 2045-51, Aug. 2015.

IONOV, Y. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, London, v. 363, n. 6429, p. 558-61, Jun. 1993.

JACA, A. et al. The role of miRNA-21 and epithelial mesenchymal transition (EMT) process in colorectal cancer. **J. Clin. Pathol.**, London, Sep. 2016. In press.

JASS, J. R. et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. **Histopathology**, Oxford, v. 41, n. 3a, p. 59-81, Sep. 2002a.

JASS, J. R. et al. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 858-66, May 2002b.

JEHAN, Z. et al. Frequent PIK3CA gene amplification and its clinical significance in colorectal cancer. **J. Pathol.**, London, v. 219, n. 3, p. 337-46, Nov. 2009.

JEONG, S. Y. et al. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 46, n. 8, p. 1069-77, Aug. 2003.

JI, Y. et al. Evaluation of in vivo antitumor effects of low-frequency ultrasound-mediated miRNA-133a microbubble delivery in breast cancer. **Cancer Med.**, Malden, v. 5, n. 9, p. 2534-43, Sep. 2016.

JOVER, R. et al. 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 140, n. 4, p. 1174-81, Apr. 2011.

JUNG, S. H.; KIM, S. H.; KIM, J. H. Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer presenting with mucinous, signet-ring, and poorly differentiated cells. **Ann. Coloproctol.**, Seoul, v. 32, n. 2, p. 58-65, Apr. 2016.

KANG, H. et al. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. **Int. J. Colorectal Dis.**, Heidelberg, v. 22, n. 2, p. 183-9, Feb. 2007.

KARANICOLAS, P. J. et al. The more the better?: the impact of surgeon and hospital volume on in-hospital mortality following colorectal resection. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 249, n. 6, p. 954-9, Jun. 2009.

KATO, S. et al. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v. 121, n. 8, p. 1771-8, Oct. 2007.

KATSIDZIRA, L. et al. The incidence and histo-pathological characteristics of colorectal cancer in a population based cancer registry in Zimbabwe. **Cancer Epidemiol.**, Amsterdam, v. 44, p. 96-100, Oct. 2016.

KAVITHA, N. et al. MicroRNAs: biogenesis, roles for carcinogenesis and as potential biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, Bangkok, v. 15, n. 18, p. 7489-97, 2014.

KE, T. W. et al. MiR-92a promotes cell metastasis of colorectal cancer through PTEN-mediated PI3K/AKT pathway. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 22, n. 8, p. 2649-55, Aug. 2015.

KIM, C. G. et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. **Br. J. Cancer**, London, v. 115, n. 1, p. 25-33, May 2016.

KIM, J. H. et al. Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: implications in the serrated neoplasia pathway. **Oncotarget**, Albany, v. 7, n. 12, p. 14095-111, Mar. 2016.

KLEFFEL, S. et al. ABCB5-targeted chemoresistance reversal inhibits merkel cell carcinoma growth. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 136, n. 4, p. 838-46, Apr. 2016.

KUMAR, A. et al. Effect of adjuvant FOLFOX chemotherapy duration on outcomes of patients with stage III colon cancer. **Clin. Colorectal Cancer**, Dallas, v. 14, n. 4, p. 262-8.e1, Dec. 2015.

LAI, C.; CHEN, Z.; LI, R. MicroRNA-133a inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis in gastric carcinoma cells via targeting fascin actin-bundling protein 1. **Mol. Med. Rep.**, Athens, v. 12, n. 1, p. 1473-8, Jul. 2015.

LAIYEMO, A. O. et al. Toward colorectal cancer control in Africa. **Int. J. Cancer**, New York, v. 138, n. 4, p. 1033-4, Feb. 2016.

LAPIDOT, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, London, v. 367, n. 6464, p. 645-8, Feb. 1994.

LE VOYER, T. E. et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 21, n. 15, p. 2912-9, Aug. 2003.

LECHLEITER, J. et al. Distinct sequence elements control the specificity of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Embo J.**, London, v. 9, n. 13, p. 4381-90, Dec. 1990.

LEE, D. W. et al. Different prognostic effect of CpG island methylation according to sex in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. **Clin. Epigenetics**, London, v. 7, n. 1, p. 63, 2015.

LEE, K. W. et al. Microsatellite instability status of interval colorectal cancers in a Korean population. **Gut Liver**, Seoul, v. 10, n. 5, p. 781-5, Apr. 2016.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec. 1993.

LEVATI, L. et al. Altered expression of selected microRNAs in melanoma: antiproliferative and proapoptotic activity of miRNA-155. **Int. J. Oncol.**, Athens, v. 35, n. 2, p. 393-400, Aug. 2009.

LI, C. et al. MiR-34a inhibits colon cancer proliferation and metastasis by inhibiting platelet-derived growth factor receptor alpha. **Mol. Med. Rep.**, Athens, v. 12, n. 5, p. 7072-8, Nov. 2015.

_____. Inhibition of SW620 human colon cancer cells by upregulating miRNA-145. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 22, n. 9, p. 2771-8, Mar. 2016.

LI, H. G. et al. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, Rome, v. 18, n. 14, p. 2048-57, 2014.

LI, J. M. et al. MicroRNA-145 regulates oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of human non-small cell lung cancer cells. **Viol. J.**, London, v. 10, p. 241, 2013.

LIEBIG, C. et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 27, n. 31, p. 5131-7, Nov. 2009.

LINNEKAMP, J. F. et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 75, n. 2, p. 245-9, Jan. 2015.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, London, v. 432, n. 7015, p. 307-15, Nov. 2004.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 5, p. 823-37, Mar. 2009.

LYRATZOPOULOS, G. et al. Absence of socioeconomic variation in survival from colorectal cancer in patients receiving surgical treatment in one health district: cohort study. **Colorectal Dis.**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 512-7, Nov. 2004.

MA, Y. et al. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. **Int. J. Cancer**, New York, v. 130, n. 9, p. 2077-87, May 2012.

MARISA, L. et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e1001453, 2013.

MEROK, M. A. et al. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. **Ann. Oncol.**, London, v. 24, n. 5, p. 1274-82, May 2013.

MORAN, A. et al. Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance. **World J. Gastrointest. Oncol.**, Pleasanton, v. 2, n. 3, p. 151-8, Mar. 2010.

MUKHERJEE, S. **The emperor of all maladies**: a biography of cancer. New York: Scribner, 2012.

MUNRO, A. J.; LAIN, S.; LANE, D. P. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. **Br. J. Cancer.**, London, v. 92, n. 3, p. 434-44, Feb. 2005.

MURAGE, P. et al. Geographical disparities in access to cancer management and treatment services in England. **Health Place**, Exford, v. 42, p. 11-18, Sep. 2016.

NAHAS, S. C. et al. Prognostic factors of surgically-treated patients with cancer of the right colon: a ten years' experience of a single university institution. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, Sao Paulo, v. 28, n. 1, p. 3-7, 2015.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, London, v. 11, n. 3, p. 220-8, Mar. 2010.

NOWELL, P. C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 46, n. 5, p. 2203-7, May 1986.

O'BRIEN, C. A. et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, London, v. 445, n. 7123, p. 106-10, Jan. 2007.

OGINO, S. et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 27, n. 9, p. 1477-84, Mar. 2009.

OLIVE, V.; JIANG, I.; HE, L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, Amsterdam, v. 42, n. 8, p. 1348-54, Aug. 2010.

OLIVEIRA MIRANDA, D. et al. Proinflammatory cytokines correlate with depression and anxiety in colorectal cancer patients. **Biomed. Res. Int.**, New York, v. 2014, p. 739650, 2014.

PAHLMAN, L. A. et al. Should the benefit of adjuvant chemotherapy in colon cancer be re-evaluated? **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 34, n. 12, p. 1297-9, Apr. 2016.

PARK, J. H. et al. Difference in time to locoregional recurrence between patients with right-sided and left-sided colon cancers. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 58, n. 9, p. 831-7, Sep. 2015.

PAWLIK, T. M.; RAUT, C. P.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. **Dis. Markers**, New York, v. 20, n. 4-5, p. 199-206, 2004.

PEERY, A. F. et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 143, n. 5, p. 1179-87.e1-3, Nov. 2012.

PENG, J. et al. Paired design study by real-time PCR: miR-378* and miR-145 are potent early diagnostic biomarkers of human colorectal cancer. **BMC Cancer**, London, v. 15, p. 158, 2015.

PEREZ, R. O. et al. Transanal Endoscopic Microsurgery (TEM) following neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: outcomes of salvage resection for local recurrence. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 23, n. 4, p. 1143-8, Apr. 2016.

PERONA, R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. **Clin. Transl. Oncol.**, Milan, v. 8, n. 2, p. 77-82, Feb. 2006.

PETERSEN, V. C. et al. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. **Gut**, London, v. 51, n. 1, p. 65-9, Jul. 2002.

PIGNOT, G. et al. Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder. **Br. J. Cancer**, London, v. 106, n. 6, p. 1177-86, Mar. 2012.

PRANDI, M. et al. Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 235, n. 4, p. 458-63, Apr. 2002.

QIN, Y. et al. miR-133a functions as a tumor suppressor and directly targets FSCN1 in pancreatic cancer. **Oncol. Res.**, Elmsford, v. 21, n. 6, p. 353-63, 2013.

QIU, T. et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 588, n. 7, p. 1168-77, Apr. 2014.

QUIRKE, P.; MORRIS, E. Reporting colorectal cancer. **Histopathology**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 103-12, Jan. 2007.

RAJAGOPALAN, H. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. **Nature**, London, v. 418, n. 6901, p. 934, Aug. 2002.

RENEHAN, A. G. et al. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. **BMJ**, London, v. 324, n. 7341, p. 813, Apr. 2002.

RIBEIRO, H. S. et al. Prognostic factors for survival in patients with colorectal liver metastases: experience of a single brazilian cancer center. **Arq. Gastroenterol.**, Sao Paulo, v. 49, n. 4, p. 266-72, Dec. 2012.

RIBEIRO, K. B. et al. KRAS mutation associated with CD44/CD166 immunoexpression as predictors of worse outcome in metastatic colon cancer. **Cancer Biomark.**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 513-21, Mar. 2016.

RIBIC, C. M. et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 349, n. 3, p. 247-57, Jul. 2003.

RICARTE FILHO, J. C.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 6, p. 1102-7, Dec. 2006.

RIGGI, N. et al. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 9, p. 916-32, May 2010.

ROCHA, J. J. et al. Transanal endoscopic operation for rectal cancer after neoadjuvant therapy. **Acta Cir. Bras.**, Sao Paulo, v. 31, p. 29-33, 2016. Supplement 1.

ROEPMAN, P. et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. **Int. J. Cancer**, New York, v. 134, n. 3, p. 552-62, Feb. 2014.

ROSA, F. et al. Trends in clinical features, postoperative outcomes, and long-term survival for gastric cancer: a Western experience with 1,278 patients over 30 years. **World J. Surg. Oncol.**, London, v. 12, p. 217, 2014.

ROTH, A. D. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 28, n. 3, p. 466-74, Jan. 2010.

RUI, Y. Y. et al. Can K-ras gene mutation be utilized as prognostic biomarker for colorectal cancer patients receiving chemotherapy? A meta-analysis and systematic review. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e77901, 2013.

SADANANDAM, A. et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nat. Med.**, New York, v. 19, n. 5, p. 619-25, May 2013.

SAMOWITZ, W. S. et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 10, n. 9, p. 917-23, Sep. 2001.

_____. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 65, n. 14, p. 6063-9, Jul. 2005.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Estado da Saúde. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. **Observatório Regional de Atenção Hospitalar (ORAH)**. 2016. Disponível em: <<http://ciis.fmrp.usp.br/orah/index.php>>. Acesso em: 12/11/2016

SATO, H. et al. High-risk stage II colon cancer after curative resection. **J. Surg. Oncol.**, New York, v. 104, n. 1, p. 45-52, Jul. 2011.

SCHEPELER, T. et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 68, n. 15, p. 6416-24, Aug. 2008.

SCHULTE, J. H. et al. MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. **Int. J. Cancer**, New York, v. 122, n. 3, p. 699-704, Feb. 2008.

SETUA, S. et al. Restitution of tumor suppressor MicroRNA-145 using magnetic nanoformulation for pancreatic cancer therapy. **J. Gastrointest. Surg.**, New York Aug. 2016. In press.

SHAH, M. A. et al. Impact of patient factors on recurrence risk and time dependency of oxaliplatin benefit in patients with colon cancer: analysis from modern-era adjuvant studies in the adjuvant colon cancer end points (ACCENT) Database. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 34, n. 8, p. 843-53, Mar. 2016.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 1, n. 1, p. 72-6, Oct. 2000.

SHEPHERD, N. A. et al. Prognostic factors in colonic cancer. **Histopathology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 613-20, Jun. 1989.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell.**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 103-12, Aug. 2002.

SHIH, I. M. et al. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 61, n. 3, p. 818-22, Feb. 2001.

SI, M. L. et al. miR-21-mediated tumor growth. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, n. 19, p. 2799-803, Apr. 2007.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. **CA Cancer J. Clin.**, Hoboken, v. 64, n. 2, p. 104-17, Mar.-Apr. 2014.

SIEGEL, R. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, Hoboken, v. 62, n. 4, p. 220-41, Jul.-Aug. 2012.

_____. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J. Clin.**, Hoboken, v. 64, n. 1, p. 9-29, Jan.-Feb. 2014.

SIGERIST, H. E. The historical development of the pathology and therapy of cancer. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, New York, v. 8, n. 11, p. 642-53, 1932.

SINICROPE, F. A. et al. Molecular biomarkers in the personalized treatment of colorectal cancer. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 651-8, May 2016.

SLATTERY, M. L. et al. Colorectal tumor molecular phenotype and miRNA: expression profiles and prognosis. **Mod. Pathol.**, New York, v. 29, n. 8, p. 915-27, May 2016.

SMIRNOV, M. et al. Colorectal cancer in southern Israel: Comparison between Bedouin Arab and Jewish patients. **Int. J. Surg.**, London, v. 33 Pt A, p. 109-16, Sep. 2016.

SMITH, D. et al. The adenoma carcinoma sequence: an indoctrinated model for tumorigenesis, but is it always a clinical reality? **Colorectal Dis.**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 296-301, May 2006.

SOBIN, L. H.; COMPTON, C. C. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. **Cancer**, New York, v. 116, n. 22, p. 5336-9, Nov. 2010.

SOREIDE, K. et al. Lymph node harvest in colon cancer: influence of microsatellite instability and proximal tumor location. **World J. Surg.**, New York, v. 33, n. 12, p. 2695-703, Dec. 2009.

SPERVESLAGE, J. et al. Establishment of robust controls for the normalization of miRNA expression in neuroendocrine tumors of the ileum and pancreas. **Endocrine**, Totowa, v. 46, n. 2, p. 226-30, Jun. 2014.

SUH, J. H. et al. Comparison of clinicopathologic characteristics and genetic alterations between microsatellite instability-positive and microsatellite instability-negative sporadic colorectal carcinomas in patients younger than 40 years old. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 45, n. 2, p. 219-28, Feb. 2002.

TAMAS, K. et al. Rectal and colon cancer: not just a different anatomic site. **Cancer Treat. Rev.**, Amsterdam, v. 41, n. 8, p. 671-9, Sep. 2015.

TANG, M. et al. MicroRNA-145 downregulation associates with advanced tumor progression and poor prognosis in patients suffering osteosarcoma. **Onco Targets Ther.**, Albany, v. 6, p. 833-8, 2013.

THE EDWIN SMITH surgical papyrus. 2016. Disponi.org/10.2147/ott.s400807/ott.s40080" iates with advancem>. Acesso em: 23/11/2016.

THIBODEAU, S. N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, Washington, v. 260, n. 5109, p. 816-9, May 1993.

TOBEY, J. A. **Cancer**: what everyone should know about It. New York: Alfred A. Knopf, 1932.

TSAI, H. L. et al. Survival in resected stage II colorectal cancer is dependent on tumor depth, vascular invasion, postoperative CEA level, and the number of examined lymph nodes. **World J. Surg.**, New York, v. 40, n. 4, p. 1002-9, Apr. 2016.

TSUCHIDA, A. et al. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. **Cancer Sci.**, Oxford, v. 102, n. 12, p. 2264-71, Dec. 2011.

UKEGJINI, K. et al. Baseline mortality-adjusted survival in colon cancer patients. **Langenbecks Arch Surg.**, Berlin, v. 401, n. 5, p. 633-41, Aug. 2016.

VAN RIJNSOEVER, M. et al. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 9, n. 8, p. 2898-903, Aug. 2003.

VELAZQUEZ, K. T. et al. MicroRNA-155 deletion promotes tumorigenesis in the azoxymethane-dextran sulfate sodium model of colon cancer. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 310, n. 6, p. G347-58, Mar. 2016.

VIEIRA, R. A. et al. Prognostic factors in locally advanced colon cancer treated by extended resection. **Rev. Hosp. Clin.**, São Paulo, v. 59, n. 6, p. 361-8, Dec. 2004.

VOGELSTEIN, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 319, n. 9, p. 525-32, Sep. 1988.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 3, p. 413-31, May 2009.

WAN, T. M. et al. The clinicopathological significance of miR-133a in colorectal cancer. **Dis. Markers**, New York, v. 2014, p. 919283, 2014.

WANG, C. et al. Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells. **Cancer Sci.**, Oxford, v. 106, n. 4, p. 375-82, Apr. 2015.

WANG, G. et al. MicroRNA-145 and MicroRNA-133a Inhibited Proliferation, Migration, and Invasion, While Promoted Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells Via Targeting FSCN1. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 60, n. 10, p. 3044-52, Oct. 2015.

WANG, L. K. et al. MicroRNA-133a suppresses multiple oncogenic membrane receptors and cell invasion in non-small cell lung carcinoma. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e96765, 2014.

WANG, Z. et al. MiR-145 regulates PAK4 via the MAPK pathway and exhibits an antitumor effect in human colon cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 427, n. 3, p. 444-9, Oct. 2012.

WORTHLEY, D. L. et al. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. **World J. Gastroenterol.**, Philadelphia, v. 13, n. 28, p. 3784-91, Jul. 2007.

WU, Z. S. et al. Loss of miR-133a expression associated with poor survival of breast cancer and restoration of miR-133a expression inhibited breast cancer cell growth and invasion. **BMC Cancer**, London, v. 12, p. 51, 2012.

XI, Y. et al. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 12, n. 7 Pt 1, p. 2014-24, Apr. 2006.

XIA, L. et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. **Int. J. Cancer**, New York, v. 123, n. 2, p. 372-9, Jul. 2008.

XU, X. et al. Downregulation of microRNA-1 and microRNA-145 contributes synergistically to the development of colon cancer. **Int. J. Mol. Med.**, Athens, v. 36, n. 6, p. 1630-8, Dec. 2015.

YAMAKUCHI, M. et al. MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e20291, 2011.

YAN, G. et al. Prognostic significance of microRNA expression in completely resected lung adenocarcinoma and the associated response to erlotinib. **Med. Oncol.**, New York, v. 31, n. 10, p. 203, Oct. 2014.

YAN, S.; CAO, Y.; MAO, A. MicroRNAs in colorectal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. **Front. Biosci. (Landmark Ed.)**, Irvine, v. 20, p. 1092-103, 2015.

YANG, G. et al. MicroRNA-522 reverses drug resistance of doxorubicin-induced HT29 colon cancer cell by targeting ABCB5. **Mol. Med. Rep.**, Athens, v. 12, n. 3, p. 3930-6, Sep. 2015.

YUAN, W. et al. Up-regulation of microRNA-145 associates with lymph node metastasis in colorectal cancer. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e102017, 2014.

YUAN, Y. et al. Prognostic and survival analysis of 837 Chinese colorectal cancer patients. **World J. Gastroenterol.**, Pleasanton, v. 19, n. 17, p. 2650-9, May 2013.

ZANUTTO, S. et al. Methylation status in patients with early stage colon cancer: a new prognostic marker? **Int. J. Cancer**, New York, v. 130, n. 2, p. 488-9, Jan. 2012.

ZHANG, G. et al. MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 59, n. 1, p. 98-107, Jan. 2014.

ZHANG, H.; LI, Y.; LAI, M. The microRNA network and tumor metastasis. **Oncogene**, Basingstoke, v. 29, n. 7, p. 937-48, Feb. 2010.

ZHANG, J. et al. miR-145 downregulates the expression of cyclin-dependent kinase 6 in human cervical carcinoma cells. **Exp. Ther. Med.**, Athens, v. 8, n. 2, p. 591-594, Aug. 2014.

ZHENG, K. et al. MicroRNA-133a suppresses colorectal cancer cell invasion by targeting Fascin1. **Oncol. Lett.**, Athens, v. 9, n. 2, p. 869-874, Feb. 2015.

ZHOU, T. et al. Overexpression of miR-92a correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. **Int. J. Colorectal Dis.**, Heidelberg, v. 28, n. 1, p. 19-24, Jan. 2013.