



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Carina de Fátima de Síba**

**Expressão de microRNAs Circulantes em Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Associado Rogério Saad Hossne

Co orientadora: Profa. Associada Patrícia Pintor dos Reis

Co orientadora: Profa. Dra. Lígia Yukie Sasaki

Colaboradora: Dra. Tainara Francini Felix

BOTUCATU

2020

*Carina de Fátima de Síba*

Expressão de microRNAs Circulantes em Doença  
de Crohn e Retocolite Ulcerativa

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Doutora em Cirurgia e  
Medicina Translacional.

Orientador: *Prof. Associado. Rogério Saad Hossne*

Coorientadora: *Profa. Associada Patrícia Pintor dos Reis*

Coorientadora: *Profa. Dra. Lígia Yukie Sasaki*

Colaboradora: *Dra. Tainara Francini Felix*

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Síbia, Carina de fatima.

Expresão de microRNAs circulantes em doença de Crohn e retocolite ucerativa / Carina de fatima Síbia. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rogério Saad Hossne

Coorientador: Pátricia Pintor dos Reis

Coorientador: Lígia Yuki Sasaki

Capes: 20202008

1. Crohn, Doença de. 2. Proctocolite. 3. Doenças inflamatórias intestinais. 4. MicroRNAs.

Palavras-chave: Doença de Crohn; Doença inflamatória intestinal; MicroRNAs.; Retocolite ulcerativa.

*Dedicatória*

Dedico este trabalho a minha **Vó Maria** (mãe) e meu **Tio Marcelo** (pai), que me muitas vezes se doaram e renunciaram seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

Muitíssimo obrigada

## *Agradecimientos*

À **Deus**, por estar sempre comigo, me guiando, me protegendo e abençoando.

Ao orientador **Dr. Rogério Saad Hossnee** e as co-orientadora **Dra. Ligia Yukie Sasaki** e **Dra. Patrícia Pintor do Reis** pela disponibilidade, compreensão e paciência frente as minhas limitações, confiança e grande apoio em todos os momentos.

À **Dra. Tainara Francini Felix** pela disponibilidade e colaboração na realização das análises das amostras.

Ao **Dr. Marco Lopez**, pelo apoio e colaboração nas análises de bioinformática.

A **Dra. Ana Elisa Valencise Quaglio** pela disponibilidade, ensinamentos, paciência e colaboração na elaboração da tese.

Ao meu marido **Alexandre Tsukada**, por todos os momentos felizes que passamos juntos, pelo amor, carinho e respeito. Obrigada por toda compreensão, paciência, incentivo e por sempre se assegurar de que estou bem e feliz. Amo você!

Às amigas da pós-graduação **Elen Farinelli**, **Fernanda Lofiego**, **Rosemary Lino**, **Robertha Biondi** e **Júlio Pinheiro Baima** pela amizade, conselhos, pelo grande apoio e incentivo durante todo esse período.

À minha amiga **Isabel Cristina** pela amizade e por me apresentar ao grupo de DII.

À secretária da pós-graduação, **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, pelas inúmeras ajudas, sempre atenciosa.

Aos **pacientes**, que aceitaram a participar desta pesquisa, por me deixar fazer parte das suas histórias de sofrimento e também de superação.

Muito **obrigada a todos** que, de alguma forma, ouviram e opinaram sobre este projeto. Todos influenciaram no seu resultado final.

Por fim, agradeço à FAPESP 2015/21882-7 e a CAPES pelo apoio financeiro.

## *Sumário*

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>Métodos</b> .....	<b>15</b>
Desenho do estudo e seleção dos participantes.....	15
Critérios de inclusão dos pacientes .....	15
Critérios de exclusão dos pacientes.....	15
Critérios de inclusão dos controles .....	15
Critérios de exclusão dos controles .....	15
Cálculo do tamanho da amostra .....	16
Aspectos Éticos .....	16
Classificação e Índice de Atividade da Doença de Crohn .....	16
Classificação e Índice de Atividade da Retocolite Ulcerativa .....	17
Resposta ao tratamento .....	17
Coleta de sangue .....	17
Extração de RNA .....	18
Reação de Transcrição Reversa de miRNAs .....	19
Amplificação pela PCR Quantitativa em Tempo Real .....	20
Análise dos dados .....	20
<b>Resultado</b> .....	<b>23</b>
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>23</b>
Características demográficas e aspectos clínicos dos pacientes com Doença de Crohn..	
.....	23

Conjuntos distintos de miRNAs apresentam expressão desregulada no plasma de pacientes com Doença de Crohn, respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso.....	25
Identificação de genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares enriquecidas .....	29
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>31</b>
Características demográficas e clínicas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa .....	32
Conjuntos distintos de miRNAs apresentam expressão desregulada no plasma de pacientes com Retocolite Ulcerativa, respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso .....	33
Identificação de genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares enriquecidas .....	37
<b>Discussão .....</b>	<b>40</b>
Doença de Crohn .....	40
Retocolite Ulcerativa .....	45
<b>Conclusão .....</b>	<b>50</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>52</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>60</b>

## *Lista de tabelas*

**TABELA 1:** Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de Doença de Crohn.

**TABELA 2:** Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de Doença de Crohn respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso.

**TABELA 3:** Características demográficas e clínicas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa.

**TABELA 4:** miRNAs significativamente desregulados no plasma de pacientes com RCU, respondedores e não respondedores ao tratamento, comparado com indivíduos saudáveis.

## *Lista de figuras*

**FIGURA 1:** Diagrama de Venn ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com DC, comuns e exclusivos aos pacientes respondedores vs não respondedores. Em preto estão mostrados os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

**FIGURA 2:** Vias moleculares enriquecidas, reguladas pelos genes-alvo de miRNAs alterados no plasma de pacientes com DC: respondedores (a) e não respondedores (b) em comparação com indivíduos saudáveis.

**FIGURA 3:** Diagrama de Venn ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com RCU, comuns e exclusivos aos pacientes respondedores vs não respondedores. Estão destacados em preto os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

**FIGURA 4:** Vias moleculares enriquecidas, reguladas pelos genes-alvo de miRNAs alterados no plasma de pacientes com RCU: Respondedores (a) e Não Respondedores (b) em comparação com indivíduos saudáveis.

*Anexos*

**ANEXO 1:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**ANEXO 2:** Índice de atividade da doença de Crohn (CDAI).

**ANEXO 3:** Classificação da Extensão da Doença de Crohn (Montreal, 2005).

**ANEXO 4:** Escore de Mayo para Avaliação da Atividade da Retocolite Ulcerativa.

**ANEXO 5:** Classificação da Extensão da Doença de Retocolite Ulcerativa.

**ANEXO 6:** Principais vias de sinalização significativas na DC em pacientes respondedores *vs* controle.

**ANEXO 7:** Principais vias de sinalização significativas na DC em pacientes não respondedores *vs* controle.

**ANEXO 8:** Principais vias de sinalização significativas na RCU em pacientes respondedores *vs* controle.

**ANEXO 9:** Principais vias de sinalização significativas na RCU em pacientes não respondedores *vs* controle.

*Resumo*

*SÍBIA, C.F. Expressão de microRNAs circulantes em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. 2020. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu, 2020.*

**Introdução:** As doenças inflamatórias intestinais são doenças crônicas representadas principalmente pela Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU). A DC caracteriza-se por focos de inflamação transmural que podem afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal (TGI). Pode ser classificada em tipo inflamatório, estenosante ou penetrante/fistulizante. Na RCU, a doença é caracteristicamente restrita à superfície da mucosa e submucosa. Os mecanismos envolvidos na patogênese de ambas as doenças ainda são desconhecidos. Ressaltamos a importância de mecanismos de regulação gênica, em particular os microRNAs (miRNAs) que estão envolvidos em processos biológicos importantes, e têm sido evidenciados como biomarcadores com potencial utilidade clínica no diagnóstico, determinação do prognóstico e tratamento dos pacientes. **Objetivo:** Identificar miRNAs circulantes com expressão significativamente alterada no plasma de pacientes com DC ou RCU, comparando os pacientes respondedores vs. não respondedores ao tratamento. **Metodologias:** Foram coletadas amostras de plasma de pacientes atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e diagnosticados com DC (n=25) ou RCU (n=30). A DC foi classificada de acordo com a classificação de Montreal e a atividade da doença foi baseada no índice CDAI. A RCU foi classificada de acordo com a extensão da doença em proctite, hemicolite esquerda e pancolite e a atividade da doença foi classificada de acordo com o escore de Mayo. O plasma foi utilizado para extração do RNA e quantificação da expressão de miRNAs na plataforma TaqMan Low Density Array. Para análises de dados utilizamos o programa *Expression Suite* com cut-off de nível de alteração, *foldchange* (FC)  $\geq 2,0$  e  $p < 0,05$ . Adicionalmente, utilizamos ferramentas de bioinformática (mirDIP, miRTarBase e ToppGeneSuite) para interpretação do significado biológico dos dados. **Resultados:** A idade média dos pacientes com DC foi de 44,4 anos e 60% eram do sexo feminino. Em relação às características clínicas, 64% dos pacientes foram diagnosticados com a doença entre 17-40 anos de idade, 36% apresentam a localização ileo colônica, 40% com comportamento estenosante, 4% apresentavam-se em atividade clínica da doença e 44% estavam em uso de terapia biológica. Identificamos 37 miRNAs significativamente alterados (FC  $\geq 2$  e  $p \leq 0,05$ ) comparados aos indivíduos saudáveis. Em pacientes respondedores ao tratamento, 22 miRNAs estavam com expressão diminuída e 3 com expressão aumentada. Nos pacientes não respondedores, 10 miRNAs estavam com expressão diminuída e 2 com expressão aumentada. Nos pacientes com RCU, a idade média foi de 51,3 anos e 53% eram do sexo feminino, 70% dos pacientes tiveram comprometimento de todo o cólon, 27% apresentavam atividade moderada e 33% dos pacientes estavam em uso de aminossalicílicos. Identificamos 37 miRNAs alterados, dos quais 18 miRNAs estavam com expressão diminuída e 1 miRNA com expressão aumentada em pacientes respondedores ao tratamento. Nos pacientes não respondedores, foram identificados 5 miRNAs com expressão diminuída e 3 com expressão aumentada. **Conclusões:** Diferentes miRNAs podem constituir biomarcadores preditivos nas diferentes formas de DII: DC e RCU.

**Palavras-chaves:** MicroRNAs, Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa, Doença Inflamatória Intestinal.

*Abstract*

*SÍBIA, C.F.* **Expression of circulating microRNAs in patients with Crohn's disease and Ulcerative Colitis.** 2020 Thesis (Doctoral) - Faculty of Medicine of Botucatu, 2020.

**Introduction:** Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases mainly represented by Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). CD is characterized by transmural inflammation foci that can affect any segment of the gastrointestinal tract (TGI). It can be classified as inflammatory, stenosing or penetrating/fistulizing. In UC, the disease is restricted to the surface of the mucosa and submucosa. The mechanisms involved in the pathogenesis of both diseases are still unknown. We emphasize the importance of mechanisms of gene regulation, in particular microRNAs (miRNAs) that are involved in important biological processes and have been shown to be biomarkers with potential clinical utility in the diagnosis, determination of prognosis and treatment of patients. **Objectives:** Identify circulating miRNAs with significantly altered expression in the plasma of patients with CD or UC, comparing responders vs. non-responders to treatment. **Methods:** Plasma samples were collected from patients seen at the Intestinal Inflammatory Diseases Outpatient Clinic from Botucatu Medical School (UNESP) diagnosed with CD (n = 25) or UC (n = 30). CD was classified according to the Montreal classification and disease activity was based on the CDAI index. The UC was classified according to the extent of the disease into proctitis, left hemicolitis and pancolitis and the activity of the disease was classified according to the Mayo score. Plasma was used to extract RNA and quantify the expression of miRNAs on the TaqMan Low Density Array platform. For data analysis we used the Expression Suite program with cut-off level of change, foldchange (FC)  $\geq 2.0$  and  $p < 0.05$ . Additionally, we use bioinformatics tools (mirDIP, miRTarBase and ToppGene Suite) to interpret the biological meaning of the data. **Results:** The average age of patients with CD was 44.4 years and 60% were female. Regarding the clinical characteristics, 64% of the patients were diagnosed with the disease between 17-40 years of age, 36% had the ileocolonic localization, 40% with stenosing behavior, 4% were in clinical activity of the disease and 44% were using biological therapy. We identified 37 significantly altered miRNAs ( $FC \geq 2$  and  $p \leq 0.05$ ) compared to healthy individuals. In patients who responded to treatment, 22 miRNAs were with decreased expression and 3 with increased expression. In non-responders, 10 miRNAs were with decreased expression and 2 with increased expression. In patients with UC, the mean age was 51.3 years and 53% were female, 70% of the patients had involvement of the entire colon, 27% had moderate activity and 33% of the patients were using aminosalicylics. We identified 37 altered miRNAs, of which 18 miRNAs were with decreased expression and 1 miRNA with increased expression in patients who responded to treatment. In non-responders, 5 miRNAs with decreased expression and 3 with increased expression were identified. **Conclusions:** Distinct sets of miRNAs can may represent predictive biomarkers in the different forms of IBD: CD and UC.

**Key words:** microRNA, Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.

# *Introdução*

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são consideradas doença crônica de causa ainda desconhecida, caracterizadas por inflamação do trato gastrointestinal (TGI), em especial no intestino delgado e no cólon. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite ulcerativa (RCU) são as formas mais comuns das DII (1).

A prevalência e a incidência destas doenças variam muito de acordo com a região e os métodos empregados no diagnóstico dos pacientes (2), apresentando maior índice em países desenvolvidos, com alto grau de industrialização, com população de origem predominantemente caucasiana, como os países do norte europeu e América do Norte (3). Um estudo europeu demonstrou prevalência de DC variando entre 1,5 e 213 casos por 100.000 habitantes, e de RCU entre 2,4 e 294 casos por 100.000 habitantes (4). Nos Estados Unidos da América, taxas de incidência de DC acima de 6,38 casos novos/100.000 habitantes/ano, e de RCU acima de 7,71 casos novos/100.000 habitantes/ano (5). Gasparini e cols. (6) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a incidência e prevalência das DII no Estado de São Paulo, Brasil. No período entre 2012 e 2015, os autores observaram uma taxa média de incidência anual das DII de 13,3 casos novos por 100.000 habitantes/ano (DC = 6,14 casos novos por 100.000 habitantes/ano; RCU = 7,16 casos novos por 100.000 habitantes/ano).

As DII ocorrem em ambos os sexos, embora exista uma discreta predominância do sexo feminino nos pacientes com DC (7). Já na RCU essa predominância parece ser discretamente a favor do sexo masculino. Ambas as doenças apresentam predominância em indivíduos caucasianos, indicando uma correlação com as influências ambientais como estilo de vida e alimentação, além de características genéticas desses indivíduos (8). Esses fatores podem levar à modificação da resposta imune padrão e à formação de resposta inflamatória alterada (7).

A DC caracteriza-se por focos de inflamação transmural que podem afetar qualquer segmento do TGI, desde a mucosa oral até o ânus e a região perianal (9), acomete o íleo terminal em 47% dos casos, o cólon em 28%, a região íleocolônica em 21% e o trato gastrointestinal superior em 3% dos casos. Pode ser classificada em tipo inflamatório (70% dos pacientes), estenosante (17% dos pacientes) ou penetrante/fistulizante ou ambos (13% dos casos) (10). Geralmente inicia-se na idade adulta precoce, causa grande impacto na qualidade de vida e capacidade laboral dos pacientes, devido à ocorrência de complicações como abscessos, fístulas, obstrução do intestino delgado e infecções, as quais podem levar à hospitalização e/ou cirurgias (11).

Na RCU, a inflamação é caracteristicamente restrita à superfície da mucosa e submucosa. O distúrbio começa no reto e geralmente se estende de maneira contínua por todo o cólon (12). A RCU é classificada como: proctite (envolvimento limitado ao reto), hemicolite esquerda (envolvendo o cólon sigmoide com ou sem envolvimento do cólon descendente) e pancolite (envolvimento de todo o cólon) (13). Essas diferentes formas de apresentação, tanto em termos de extensão como em intensidade de inflamação, têm como um dos principais fatores as características genéticas individuais, ainda pouco elucidadas (14). A RCU evolui em surtos, ocorrendo períodos de exacerbação e remissão das lesões e dos sintomas, às vezes ao longo de muitos anos (14). Assim como na DC, as manifestações sistêmicas como fadiga, febre, anorexia e emagrecimento, são também encontradas na maioria dos pacientes com RCU (15). A dor abdominal é variável de acordo com a intensidade da inflamação, sendo em geral leve a moderada, podendo tornar-se severa nas complicações, tais como no megacólon tóxico (14). O risco de câncer colorretal (CCR) na colite ulcerosa é aumentado em pacientes com doença de longa data em comparação com a população em geral, com

risco cumulativo de 2% após 10 anos de diagnóstico, 8% após 20 anos e 18% após 30 anos (16).

O tratamento da DII requer frequentemente terapia a longo prazo, baseada na combinação de medicamentos para controlar a doença, como aminossalicilatos, corticóides, imunomoduladores (tiopurinas, tacrolimus e metotrexato) e terapia biológica como os agentes anti-fator de necrose tumoral (anti-TNF) (infliximabe e adalimumabe (17) anti-integrinas como o vedolizumabe ou anti-interleucinas.

Assim sendo, DII envolve complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Entretanto, os mecanismos envolvidos na sua patogênese ainda são desconhecidos (7). Estudos indicam que muitos genes estão alterados na DC e RCU, além daqueles envolvidos na resposta imune. Apesar desse conhecimento prévio, os mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento das diferentes formas de DII não são entendidos, bem como as diferentes respostas do pacientes aos tratamentos empregados (18).

Ressaltamos a importância dos mecanismos de regulação gênica, por meio da ação de RNAs não codificantes, em particular os microRNAs (miRNAs), nos mecanismos moleculares de doenças como a DII. Os miRNAs são RNAs pequenos, de aproximadamente 18-22 nucleotídeos de comprimento não codificantes porém importantes reguladores pós-transcricionais de genes codificantes de proteínas (19). Os miRNAs estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose e proliferação celular (20). Além disso, desempenham papéis importantes em doenças humanas, incluindo doenças crônico-degenerativas. Nos últimos anos, os miRNAs têm sido evidenciados como importantes moduladores da resposta imune (19). Adicionalmente, têm sido evidenciados como biomarcadores com potencial utilidade clínica no diagnóstico,

determinação do prognóstico e tratamento de pacientes com doenças como por exemplo o câncer (21).

Uma característica importante dos miRNAs é a sua estabilidade e facilidade de detecção em fluidos corporais; portanto, a expressão de miRNAs pode ser quantificada em amostras clinicamente relevantes, tais como plasma ou soro. De fato, estudos têm demonstrado a utilidade de análise de perfis de sua expressão como biomarcadores no plasma ou no soro humano (22).

De acordo com dados do miRBase (data de acesso atualizada em:05 de Dezembro, 2019) ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), um banco de dados que fornece informações integradas sobre sequência de miRNAs, até o momento, foram descritos e caracterizados 2.654 miRNAs no genoma humano (23). Neste contexto, a identificação de alterações na expressão de miRNAs em pacientes com DC ou RCU deve contribuir para a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DII. Além disso, miRNAs poderão constituir biomarcadores clinicamente relevantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e ou impactar o desenvolvimento de terapêuticas mais precisas para pacientes com essas doenças.

Alterações em miRNAs em pacientes com DII foram descritas pela primeira vez por Wu F. e col. em 2008 (24). Nesse estudo, amostras de mucosa de pacientes com RCU ativa apresentaram níveis aumentados de 8 miRNAs e diminuídos de 3 miRNAs em comparação com amostras de indivíduos saudáveis que não apresentavam RCU. Esses autores observaram que o miR-192, normalmente expresso em células epiteliais do cólon, estava significativamente reduzido em tecidos de cólon de pacientes com RCU ativa (24). O miR-192 foi demonstrado regular negativamente a expressão de peptídeo 2-alfa macrófagos inibitório, expressa em células epiteliais (25).

A identificação do perfil global de expressão de miRNAs circulantes foi realizada em estudo incluindo 20 pacientes com RCU e 20 indivíduos controle (19). Por meio de análise de microarranjos de miRNAs, os autores identificaram 31 miRNAs diferencialmente expressos em indivíduos com RCU vs. controles. O perfil de expressão de miRNAs circulantes mostrou precisão de 92,8%, especificidade de 96,2% e sensibilidade de 89,5%, sugerindo que os miRNAs identificados podem constituir biomarcadores com utilidade no diagnóstico não invasivo de RCU (19).

A expressão diferencial de miRNAs no sangue periférico ou no plasma pode ser ferramenta útil para o diagnóstico e diferenciação dos subtipos da DII. As diferentes células imunológicas circulantes associadas com DC e RCU refletem a expressão alterada de miRNAs no sangue periférico (26). Um exemplo é o miR-126, que se apresentou aumentado em pacientes com RCU ativa. Este miRNA pode desempenhar papel importante na regulação da inflamação em doenças inflamatórias crônicas, uma vez que tem como uma de suas funções bloquear o inibidor do fator nuclear-kappa B alfa, o qual atua como inibidor da via de sinalização NF-kB (26).

Embora os estudos citados acima indiquem o envolvimento de miRNAs em DII, a maioria destes é baseado na investigação de um painel limitado de miRNAs. Além disso, não há relatos da expressão global de miRNAs circulantes e da sua correlação com mecanismos de interação entre genes potencialmente regulados por miRNAs em DII. A análise de expressão de miRNAs, integrada à análise de expressão dos genes-alvo regulados por miRNAs alterados, contribuirá para elucidar mecanismos moleculares associados à patogênese das DII. Particularmente, os miRNAs podem constituir biomarcadores úteis na diferenciação de pacientes com as diferentes formas de DII, respondedores e não respondedores ao tratamento.

A fim de contextualizar nosso trabalho com os dados da literatura, realizamos uma pesquisa na base de dados PubMed e identificamos estudos de miRNAs circulantes em DII. Utilizando as palavras-chaves: “microRNA AND circulating AND inflammatory bowel disease”, identificamos 30 artigos científicos publicados em revistas indexadas (pesquisa atualizada aos 02 de Dezembro de 2019). Todos os artigos foram analisados e dos 30 artigos identificados, 17 foram excluídos pelas seguintes razões: 7 tratavam de outras doenças, como o câncer; 6 eram outros tipos de estudo não contendo dados experimentais(revisão da literatura e editoriais); 1 em outra língua que não o inglês e 3 referiam-se à estudos de DNA. Os 13 estudos restantes estão relacionados à miRNAs circulantes em pacientes com DII, em amostras de plasma, soro e tecidos. Os estudos encontram-se organizados no **Quadro1**, em ordem cronológica ascendente.

**Quadro 1.** Descrição dos estudos publicados avaliando miRNAs circulantes em doença inflamatória intestinal, com pelo menos um dos objetivos sendo a análise de expressão de miRNAs.

Estudo	Tipo de amostras	Pacientes controle	Doença	Delineamento e métodos	Resultados principais	Conclusões principais do estudo
Chen et al. 2019 (27)	Soro	Soro: 140	Coorte de descoberta DC: 40 UC: 40 Controles saudáveis: 40Coorte de treinamento DC:100 UC: 100 Controles saudáveis:100 Coorte de validação DC:66 Controle pacientes: 41	RT-qPCR	Expressão sérica de miRNA 146b - 5p (miR - 146b - 5p) foi 2,87- e 2,72 vezes maior em pacientes com DC e RCU	MiR - 146b - 5p pode refletir melhor a inflamação da mucosa na DII do que a PCR.
Schönauen et al. 2018 (28)	Soro e fezes	Soro: 20 Fezes: 15	DC: 36 soro e 39 fezes RCU: 15 soro e 18 fezes	RT-qPCR	Expressão aumentada nos miR-16, miR-21 e miR-223, mas não miR-155, em comparação com os controles e foram maiores na DC do que nos pacientes com RCU.	Correlacionaram a expressão de miRNAs nas fezes com a atividade da doença; sugeriram os miRNAs como potenciais biomarcadores em DII.
Sun et al. 2017 (29)	Plasma	Plasma: 37	DC ativo: 29 DC remissão: 37	RT-qPCR	A expressão de miR-125a foi diminuída em pacientes com DC e aumentou quando os pacientes alcançaram remissão clínica (após tratamento em três meses)	Na DC ativa, a expressão de miRNAs foi correlacionada negativamente com a gravidade da doença e com a expressão de citocinas inflamatórias em pacientes com doença de Crohn.

Oikonomopoulo et al. 2016 (30)	Soro	Soro: 21	DC ativo: 21 DC remissão: 24	Nanostring Technology	2 miRNAs (hsa-miR-1286 e hsa-miR1273d) expressão diminuída em DC ativa em relação aos em remissão.	Demonstraram diferenças significativas na expressão de miRNAs séricos circulantes; sugeriram que os miRNAs devem constituir novos marcadores em DII;
Wang et al. 2016 (31)	Soro	Soro: 50	DC: 50 RCU: 50	RT-qPCR	miR-223 apresentaram expressão aumentado na CD e RCU, teve uma correlação positiva com indicadores de atividade da doença tanto na DC quanto na UC, sugerindo que o nível de miR-223 estava associado à atividade da doença de DII.	O miR-223 sérico foi um método mais confiável para monitorar a atividade da doença do que a VHS ou a PCR podendo servir como um novo biomarcador para a DII.
Polytarchou et al. 2015 (32)	Soro	Soro: 21	RCU ativo: 24 RCU remissão: 22	Nanostring Technology	6 miRNAs (miR-4454, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-148b-3p, miR-320e e miR-4516) expressão diminuídos em RCU remissão comparados com RCU ativa e pacientes em remissão comparados com os ativos não atingiu significância estatística.	A análise de subgrupos específicos dos pacientes e os miRNAs séricos identificados, podem ser parâmetros a serem testados, pela sua utilidade na estratificação de risco, monitoramento da atividade da doença e avaliação das respostas aos medicamentos.

Jensen et al. 2015 (33)	Plasma	Plasma: 6	DC: 6 Coorte de validação DC:102	RT-qPCR	6 miRNAs(miR-369-3p, miR-376a, miR-376, miR-411 , miR-411) com expressão diminuído nos pacientes com CD em comparação com controles e 3 miRNAs (miR-200c, miR-181-2p e miR-125a-5p) com expressão. Coorte de validação, apenas o miR-16 foi significativamente reduzido.	A análise identificou nove miRNAs plasmáticos diferencialmente expressos em pacientes com DC em comparação com controles. Em uma validação clinicamente relevante, sintomática coorte, apenas hsa-miR-16 foi expresso diferencialmente, Será importante realizar estudos adicionais que validem nossos achados de biomarcadores de miRNAs.
Lewis et al. 2015 (34)	Soro	1ºcoorte: soro: 5 2º coorte: soro:5	1ºcoorte DC estenosante: 13 DC não estenosante: 16 2º coorte DC estenosante: 6 DC não estenosante 11	RT-qPCR	Os miR-19a-3p e miR-19b-3p apresentou expressão diminuída quando comparado com controle nas duas coortes.	A análise sérica em pacientes com 4 anos de acompanhamento confirma a hipótese de que o miR-19a-3p e o miR-19b-3p reduziram o desenvolvimento de estenose
Krissansen Et al. 2015 (35)	Soro	Soro: 58	DC: 57 DC ativo: 10 RCU: 62 RCU ativo: 10	RT-qPCR	MiR-595 e miR-1246 foram significativamente aumentados nos soros de pacientes com DC, RCU quando comparados com controle	Os miRNAs miR-595 e miR-1246 serão possíveis biomarcadores em pacientes com DC e RCU ativos.

Zahm et al. 2014 (36)	Tecido Soro	Tecido:50 Soro: 18	Tecido DC:12 RCU:18 Soro DC:11 RCU:18	RT-qPCR	O miR-24 no tecido estava aumentado na RCU quando comparado com a DC e foi o único miRNA alterado entre os subtipos de DII. Nenhum miRNAs sérico foram encontrados para distinguir DC da RCU.	O estudo apresentou algumas limitações como: pouca amostra de soro e tecido, interferindo na análise de miRNA.Será importante realizar estudos adicionais que validem nossos achados de biomarcadores de miRNAs.
Paraskevi et al. 2012 (37)	Sangue	Sangue : 162	DC: 128 RCU: 88	RT-PCR	11 miRNAs (miR-16, miR-23a, miR-29a, miR-106a, miR-107, miR-126, miR-191, miR-199a-5p, miR-200c, miR-362-3p e miR-532-3p com expressão aumentada na DC em comparação com os controles. Na RCU, três miRNAs (miR-16, miR-21, miR-28-5p, miR-151-5p, miR-155 e miR-199a-5p) foram significativamente aumentados em comparação com controles.	Vários miRNAs podem distinguir DC de RCU. Os miRNAs podem representar novos biomarcadores não invasivos para distinguir UC e CD.
Zahm et al. 2011 (38)	Soro	Soro: 32	DC: 46	RT-qPCR	Foram encontrados 24 miRNAs com expressão aumentada. dos quais foram escolhidos 11(miR-16,miR-484, miR-30e, miR-106a, miR-195, miR-20a, miR-21, miR-140, Let-7b, miR-192 e miR-93)para estudo de validação.	Os 11 miRNAs séricos validados podem ser úteis como biomarcadores não invasivos na DC

Wu et al. 2011 (39)	Sangue	Sangue: 13	DC ativo: 14 DC inativo: 5 RCU ativo: 10 RCU inativo: 10	RT-qPCR	Na DC ativa foram identificados 12 aumentados e 6 diminuídos. Na RCU foram identificados 12 miRNAs aumentados e 5 miRNAs diminuídos, 8 miRNAs (miRs-28-5p, -103-2 *, 149 *, -151-5p, -340 *, -505 *, -532-3p e miR-plus-E1153) foram capazes de distinguir DC ativa de RCU ativa.	Os dados confirmam a evidência de que DC e RCU estão associadas a diferentes tipos de células imunes circulantes e que a expressão diferencial de miRNAs do sangue periférico pode formar a base de futuros testes de diagnóstico para doença inflamatória intestinal .
------------------------	--------	------------	---	---------	---	---

---

## ***Objetivos***

## **Geral**

- Identificar o perfil global de níveis circulantes de miRNAs no plasma de pacientes com DC e RCU *versus* controle.

## **Específicos**

- Identificar alterações na expressão de miRNAs circulantes no plasma de pacientes com DC e RCU de acordo com resposta ao tratamento medicamentoso (respondedores *versus* não respondedores).
- Correlacionar os perfis de expressão de miRNAs com a resposta ao tratamento nas diferentes formas da doença (pacientes respondedores *versus* não respondedores);
- Identificar os genes-alvo preditos a serem regulados pelos miRNAs alterados em DC ou RCU;
- Identificar vias moleculares enriquecidas e potencialmente associadas com as diferentes formas da doença.

## *Metodologia*

### **Desenho do estudo e seleção dos participantes**

Foi realizado estudo transversal com inclusão de 55 pacientes ambulatoriais atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de Setembro de 2016 a Março de 2017. O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis voluntários (n=10), do sexo masculino e feminino, com faixa etária entre os 23 – 59 anos, os quais tiveram amostras de sangue coletadas para exames de rotina. Alíquotas de sangue excedentes foram coletadas e utilizadas na pesquisa.

### **Critérios de inclusão dos pacientes**

- pacientes diagnosticados com DII (RCU e DC), de qualquer classificação clínica, maiores de 18 anos e que concordaram em participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **Critérios de exclusão dos pacientes**

- pacientes com outras condições clínicas e/ou com diagnóstico de câncer.

### **Critérios de inclusão dos controles**

- indivíduos saudáveis com idade entre 18 anos e 60 anos.

### **Critérios de exclusão dos controles**

- presença de sintomas como: dor abdominal, diarreia, sangue nas fezes, febre, perda de peso, perda de apetite e anemia.

### **Cálculo do tamanho da amostra**

O tamanho da amostra foi baseado na amostra de conveniência, baseado no número de pacientes atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (n=300).

### **Aspectos Éticos**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) protocolo 3547/2010-A. O estudo seguiu as recomendações éticas, incluindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**).

### **Classificação e Índice de Atividade da Doença de Crohn**

A atividade clínica da doença foi baseada no Índice de atividade da doença de Crohn (CDAI), um sistema de avaliação de gravidade da doença, que utiliza 8 variáveis objetivas e subjetivas. Em cada escala de pontuação de 0 a 600, é possível classificar entre resposta clínica (queda de 70 a 100 pontos); remissão clínica (valor total  $\leq 150$  pontos), atividade leve (50-250 pontos), atividade moderada (250-350 pontos) e atividade grave ( $>350$  pontos) (40) (**Anexo 2**).

A classificação da doença foi baseada na Classificação de Montreal, um sistema de avaliação da extensão e comportamento da doença. Esta classificação subdivide a doença de acordo com três características fenotípicas principais: idade do diagnóstico (A1 abaixo de 16 anos, A2 entre 17 a 40 anos e A3 acima dos 40 anos), localização topográfica (L1 ileal, L2 colônica, L3 ileocolônica e L4 trato gastrointestinal superior) e

comportamento clínico (B1 não estenosante, não penetrante, B2 estenosante, B3 penetrante e P doença perianal) (41) (**Anexo 3**).

### **Classificação e Índice de Atividade da Retocolite Ulcerativa**

A atividade da doença foi baseada no escore de Mayo, um sistema de avaliação que integra aspectos clínicos e endoscópicos. Hábito intestinal, sangramento retal, aspecto da mucosa visto pela colonoscopia e aspecto clínico global são os parâmetros seguidos (42) (**Anexo 4**).

A RCU foi classificada de acordo com a extensão máxima da inflamação observada por meio da colonoscopia e foi dividida, em colite distal, hemicolite esquerda e pancolite (43) (**Anexo 5**).

### **Resposta ao tratamento**

Resposta ao tratamento foi definida de acordo com critérios clínicos, baseado no CDAI para pacientes com DC e no escore de Mayo para pacientes com RCU, pois nem todos os pacientes apresentavam exames endoscópicos de rotina durante a realização do estudo.

### **Coleta de sangue**

De todos os pacientes ou indivíduos saudáveis, foram coletados 5mL de sangue (em tubo com EDTA) por punção de veia periférica, com o intuito de analisar a expressão de miRNAs circulantes. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 1.200 rpm para a obtenção do plasma livre de células. Após a centrifugação, as amostras de plasma foram congeladas em tubos separados em freezer a -80° C, até a extração do RNA. O processamento das amostras, bem como todas as outras etapas

experimentais posteriores foram realizado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX).

### **Extração de RNA**

A extração do RNA foi realizada utilizando o miRNeasySerum/Plasma Kit (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Para tal, foi utilizada uma alíquota de 200µL de plasma. À cada amostra de plasma, foram adicionados 1.000µL de reagente de lise (fornecido pelo kit) e as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (TA), a fim de desnaturar complexos de proteínas e RNAses e remover DNA residual. Logo após foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada amostra e incubadas por 3 minutos em TA, e em seguida centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos a 4°C. A centrifugação permite que cada amostra seja separada em fases orgânicas e aquosa, sendo que a fase aquosa contém o RNA de interesse. A seguir, a fase aquosa foi então transferida para novos tubos eppendorf, estéreis e livres de RNAses e a cada amostra foi adicionado 900µL de etanol 100%, para ligação das moléculas de RNA com tamanho igual ou superior a 18 nucleotídeos, dessa forma enriquecendo as amostras com RNAs pequenos (miRNAs).

As próximas etapas consistiram na purificação do RNA através de colunas com filtro, onde o RNA total (incluindo os miRNAs) é ligado à membrana e os contaminantes são descartados no material filtrado. A fase aquosa contendo etanol foi transferida para as colunas com filtro que foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Adicionou-se 700µL da solução de lavagem *Buffer RWT* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Adicionou-se 500µL da solução de lavagem *Buffer RPE* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por

15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Adicionou-se 500µL de etanol 80%, seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 2 minutos a 25°C e o filtrado foi desprezado.

Uma nova centrifugação foi realizada para secagem das colunas a 14.000 rpm, por 5 minutos a 25°C. A coluna com filtro foi então transferida para um novo tubo coletor fornecido pelo kit para a eluição do RNA pela adição de 15µL de água estéril e livre de RNase (Sigma-Aldrich) no centro do filtro, o qual foi incubado por 1 minuto em TA, seguido de centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm a 25°C. O RNA obtido foi armazenado a -80°C até a sua utilização.

A análise de quantificação e avaliação da qualidade e pureza das amostras de RNA foi realizada no equipamento *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific), o qual permite quantificar o RNA total contido em cada amostra e verificar a presença de contaminação por proteínas e/ou resíduos de solventes orgânicos. O RNA obtido foi utilizado para transcrição reversa (produção de cDNA) e posterior amplificação pela PCR quantitativa em tempo real.

### **Reação de Transcrição Reversa de miRNAs**

A transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) combinado com o Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 do mesmo fabricante e segundo o protocolo recomendado. Esse sistema permite a transcrição reversa dos miRNAs maduros para análise na plataforma *Taqman® LowDensityArrayCard A* (Thermo Fisher Scientific). Essa plataforma consiste em um cartão com sondas liofilizadas representando 384 miRNAs humanos com sequências conhecidas e depositadas no miRBase. A plataforma inclui três controles (miRNAs endógenos) para normalização dos dados e um ensaio

não humano como controle negativo. Para a reação de RT, foram adicionados Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs com dTTP (100mM), MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*(50U/μL), 10X RT Buffer, inibidor de RNase (*RNaseInhibitor*) (20U/μL). A mistura desses componentes com o RNA foi incubada por 40 ciclos, a 16°C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto e 50°C por 1 segundo; seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 minutos. As amostras de cDNA obtidas foram mantidas a -20°C até sua utilização.

### **Amplificação pela PCR Quantitativa em Tempo Real**

Para a reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-QPCR) utilizou 450 μL de Master Mix TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems); 6 μL de cDNA (produzido na etapa anterior) e 444 μL de água estéril e livre de RNase. Foram adicionados 100 μL desse mix em cada um dos oito poços do cartão, seguido por centrifugação a 1.200 rpm por 1 minuto, duas vezes. A RT-QPCR foi realizada no equipamento *QuantStudio 12K Flex* (Applied Biosystems). Para a normalização dos dados foi aplicada a normalização global, conforme descrita por Mestdaghetal.(44) e que consiste em um método de normalização recomendado para análise de um grande número (384 ou maior) de alvos.

### **Análise dos dados**

Essa etapa consistiu na interpretação dos dados de expressão de miRNAs. Os dados foram analisados utilizando o programa *ExpressionSuite v1.0.3*, o qual permite quantificar a expressão relativa de miRNAs comparada com os controles. Para a determinação de miRNAs diferencialmente expressos, utilizamos o cálculo do número de vezes no qual um miRNA está com expressão maior (aumentada) ou menor

(diminuída) comparado com os controles (plasma de indivíduos saudáveis), de maneira similar a outros estudos. Utilizamos um cut-off de 2,0 e  $p \leq 0,05$  para a seleção de miRNAs estatisticamente significativos (45).

Para a análise de predição dos genes-alvos utilizamos ferramentas de bioinformática: portal de integração de dados miRNA (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>), usando como critério para seleção de alvos, resultados com "muito alto" (1% superior) e "alto" (5% superior) score para probabilidade de interação (46).

Além disso, incluímos interações validadas no miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) (47). Adicionalmente, realizamos análises de enriquecimento para a identificação de funções biológicas dos genes-alvo dos miRNAs, utilizando a ferramenta ToppGeneSuite (<https://toppgene.cchmc.org/>) (48).

Com o objetivo de visualizar miRNAs comumente alterados em DC e RCU, ou exclusivos de cada doença, foram construídos diagramas de Venn, utilizando o programa InteractiVenn (49).

## *Resultados*

## ***CAPÍTULO 1.***

### **Características demográficas e aspectos clínicos dos pacientes com Doença de Crohn**

Foram analisados 25 pacientes com DC (15 mulheres e 10 homens), com idade média de 44,4 anos. A maioria (84%) se auto declararam como pertencentes à raça branca. Com relação ao tabagismo, a maioria (88%) dos pacientes era ex-fumantes ou não tabagistas e 12% eram fumantes. Em relação ao consumo de álcool, 8% eram etilistas. Quanto ao tratamento, 16% estavam sem tratamento e 44% dos pacientes estavam em uso de terapia biológica. Em relação às características clínicas, de acordo com a Classificação de Montreal, 64% dos pacientes foram diagnosticados com a doença entre os 17 e 40 anos de idade (A2), 36% apresentam a localização ileocolonica (L3) e 40% apresentaram comportamento estenosante (B2). Apenas um paciente apresentou (L4) - TGI (trato gastrointestinal superior); 40% dos pacientes apresentaram fístulas, sendo 92% destas de localização perianal. De acordo com o CDAI, no momento da coleta, 60% dos pacientes apresentavam-se em remissão clínica, e 4% apresentavam-se em atividade clínica da doença. A **Tabela 1** apresenta os dados demográficos e características clínicas dos pacientes com DC e as características clínicas dos pacientes Respondedores e Não Respondedores, vinte e dois (88%) dos pacientes foram considerados respondedores ao tratamento.

**Tabela 1:** Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de Doença de Crohn.

<b>Doença de Crohn</b>	<b>n (%)</b>	<b>Respondedores N=22</b>	<b>Não respondedores n=3</b>
<b>Idade, média (DP)</b>	44,4		
<b>Sexo</b>			
Feminino	15 (60)	13	1
Masculino	10 (40)	9	2
<b>Etnia</b>			
Branco	21 (84)	19	3
Pardo	2 (8)	1	-
Negro	2 (8)	2	-
<b>Etilismo</b>			
Sim	2 (8)	1	-
Não	23 (92)	21	3
<b>Tabagismo</b>			
Sim	3 (12)	1	-
Não	22 (88)	21	3
<b>Tratamento</b>			
Aminossalicílicos	5 (20)	4	1
Imunomoduladores	5 (40)	7	-
Terapia biológica	11 (44)	11	1
Sem tratamento	4 (16)	-	1
<b>Classificação de Montreal</b>			
A1 ≤16 anos	1 (4)	1	-
A2 17-40 anos	16 (64)	14	3
A3 > 40 anos	8 (32)	7	-
<b>Localização</b>			
L1-Íleo terminal	8 (32)	6	1
L2-Colon	7 (28)	5	-
L3-Ileocolon	9 (36)	10	2
L4- TGI superior	1 (4)	1	-
<b>Comportamento</b>			
B1- Não estenosante, não penetrante	5 (20)	5	-
B2-Estenosante	10 (40)	9	2
B3-Penetrante	3 (12)	2	-
B2-Estenosante + B3-Penetrante	9 (36)	6	1
<b>Doença Perianal</b>			
Presença	10 (40)	9	1
Ausência	15 (60)	13	2
<b>Localização da fístula</b>			
Perianal	24 (96)	8	1

Reto vaginal	1 (1)	1	-
<b>CDAI</b>			
Remissão	15 (60)	16	-
Leve	6 (24)	5	1
Moderada	3 (12)	1	1
Grave	1 (4)	-	1

**Conjuntos distintos de miRNAs apresentam expressão desregulada no plasma de pacientes com Doença de Crohn, respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso.**

As análises foram realizadas para identificar os diferentes níveis de expressão dos miRNAs no plasma de pacientes com DC, respondedores e não respondedores ao tratamento em comparação com indivíduos saudáveis.

Na análise de pacientes respondedores ao tratamento encontramos 25 miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa ( $FC \geq 2$  e  $p < 0,01$ ) sendo 22 miRNAs (miR-19a-3p, miR-150-5p, miR-885-5p, miR-660-5p, miR-122-5p, miR-132-3p, miR-518e-3p, miR-483-5p, miR-193b-3p, miR-486-3p, miR-25-3p, miR-532-5p, miR-486-5p, miR-192-5p, miR-425-5p, miR-507, miR-140-3p, miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-324-3p, miR-215-5p e miR-92a-3p) com expressão diminuída e 3 miRNAs (let-7f-5p, miR-200b-3p e miR-190a-5p) com expressão aumentada.

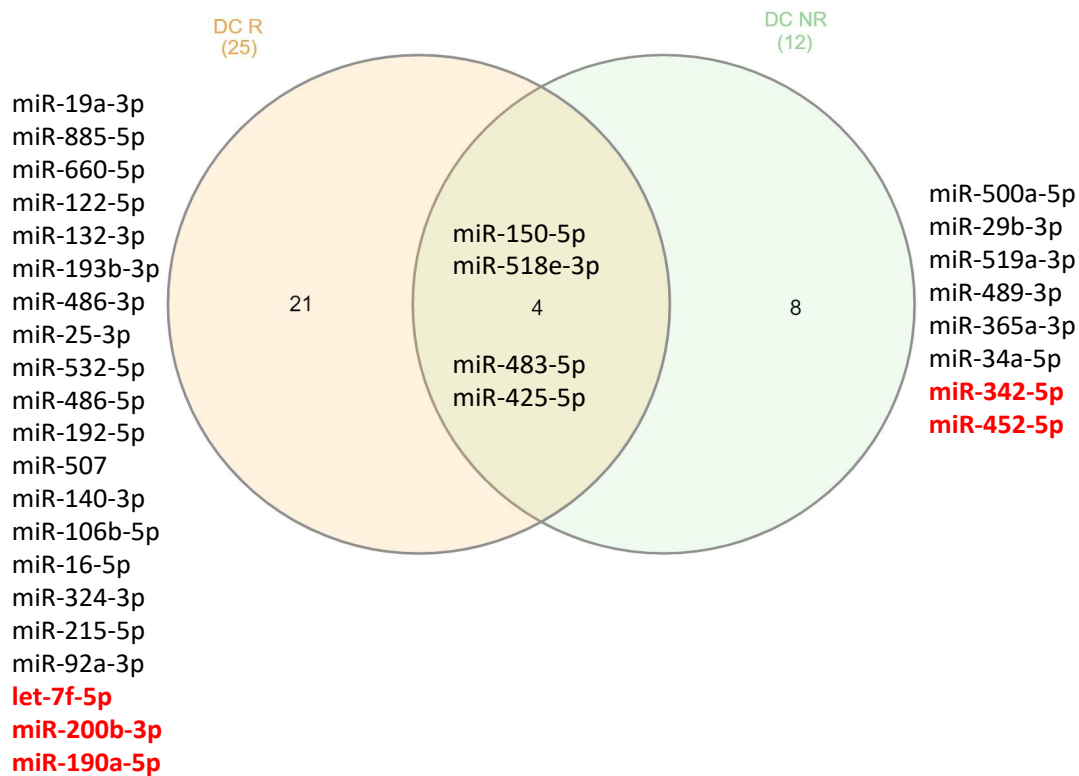
Já na análise de pacientes não respondedores, 10 miRNAs (miR-500a-5p, miR-29b-3p, miR-150-5p, miR-483-5p, miR-519a-3p, miR-489-3p, miR-425-5p, miR-518e-3p, miR-365a-3p e miR-34a-5p) se apresentaram com expressão diminuída e 2 (miR-452-5p e miR-342-5p) com expressão aumentada, totalizando 12 miRNAs alterados. Esses dados estão descritos na **Tabela 2**.

Quando analisados em conjunto, foram identificados 4 miRNAs circulantes (miR-150-5p, miR-518e-3p, miR-483-5p e miR-425-5p) comum entre os respondedores e não respondedores, 21 miRNAs exclusivos dos pacientes respondedores (miR-19a-3p, miR-885-5p, miR-660-5p, miR-122-5p, miR-132-3p, miR-193b-3p, miR-486-3p, miR-25-3p, miR-532-5p, miR-486-5p, miR-192-5p, miR-507, miR-140-3p, miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-324-3p, miR-215-5p, miR-92a-3p, let-7f-5p, miR-200b-3p e miR-190a-5p) e 8 miRNAs exclusivos aos não respondedores (miR-500a-5p, miR-29b-3p, miR-519a-3p, miR-489-3p, miR-365a-3p, miR-34a-5p, miR-342-5p e miR-452-5p) **(Figura 1)**.

**Tabela 2.** miRNAs plasmáticos circulantes significativamente desregulados em pacientes com Doença de Crohn, respondedores ou não respondedores ao tratamento, comparado com indivíduos saudáveis.

<b>Respondedores</b>				<b>Não respondedores</b>			
<b>Expressão diminuída</b>				<b>Expressão diminuída</b>			
<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p-value</b>	<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p-value</b>
miR-19a-3p	0,014	-6,16	0,009	miR-500a-5p	0,016	-5,97	0,003
miR-150-5p	0,066	-3,92	0,000	miR-29b-3p	0,025	-5,32	0,004
miR-885-5p	0,069	-3,86	0,003	miR-150-5p	0,063	-3,99	0,000
miR-660-5p	0,076	-3,72	0,008	miR-483-5p	0,09	-3,47	0,000
miR-122-5p	0,083	-3,59	0,004	miR-519a-3p	0,097	-3,37	0,001
miR-132-3p	0,088	-3,51	0,012	miR-489-3p	0,12	-3,06	0,000
miR-518e-3p	0,091	-3,46	0,006	miR-425-5p	0,158	-2,66	0,000
miR-483-5p	0,096	-3,38	0,000	miR-518e-3p	0,172	-2,54	0,003
miR-193b-3p	0,114	-3,13	0,008	miR-365a-3p	0,198	-2,34	0,001
miR-486-3p	0,121	-3,05	0,000	miR-34a-5p	0,203	-2,30	0,000
miR-25-3p	0,132	-2,92	0,000				
miR-532-5p	0,168	-2,57	0,001				
miR-486-5p	0,171	-2,55	0,000				
miR-192-5p	0,172	-2,54	0,002				
miR-425-5p	0,178	-2,49	0,005				
miR-507	0,192	-2,38	0,010				
miR-140-3p	0,200	-2,32	0,002				
miR-106b-5p	0,234	-2,10	0,011				
miR-16-5p	0,235	-2,09	0,001				
miR-324-3p	0,24	-2,06	0,012				
miR-215-5p	0,243	-2,04	0,011				
miR-92a-3p	0,265	-1,92	0,002				
<b>Expressão aumentada</b>				<b>Expressão aumentada</b>			
<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p-value</b>	<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p-value</b>
let-7f-5p	4,287	2,10	0,000	miR-452-5p	5,114	2,35	0,001
miR-200b-3p	7,53	2,91	0,005	miR-342-5p	4,407	2,14	0,000
miR-190a-5p	8,659	3,11	0,012				

RQ= valor da expressão do miRNA .LogFC=log de foldchange (valores negativos indicam expressão diminuída e valores positivos indicam expressão aumentada). P-value= Valor -p: teste ANOVA.

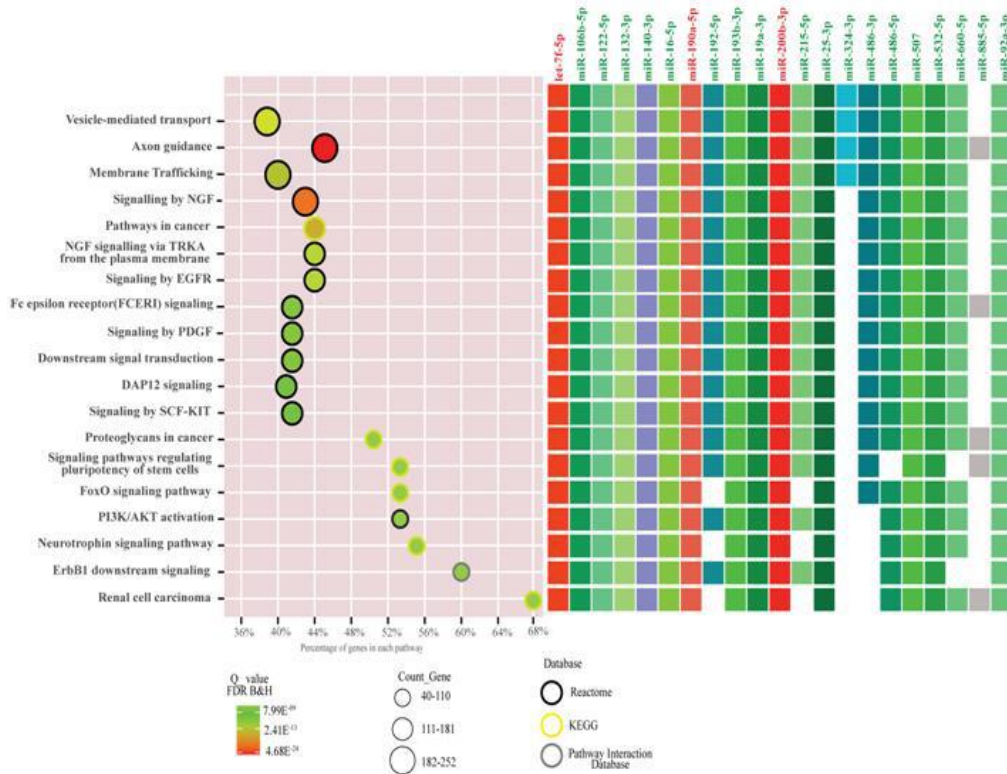


**Figura 1.** Diagrama de Venn ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com DC, comuns e exclusivos aos pacientes respondedores vs não respondedores. Em preto estão mostrados os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

## **Identificação de genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares enriquecidas**

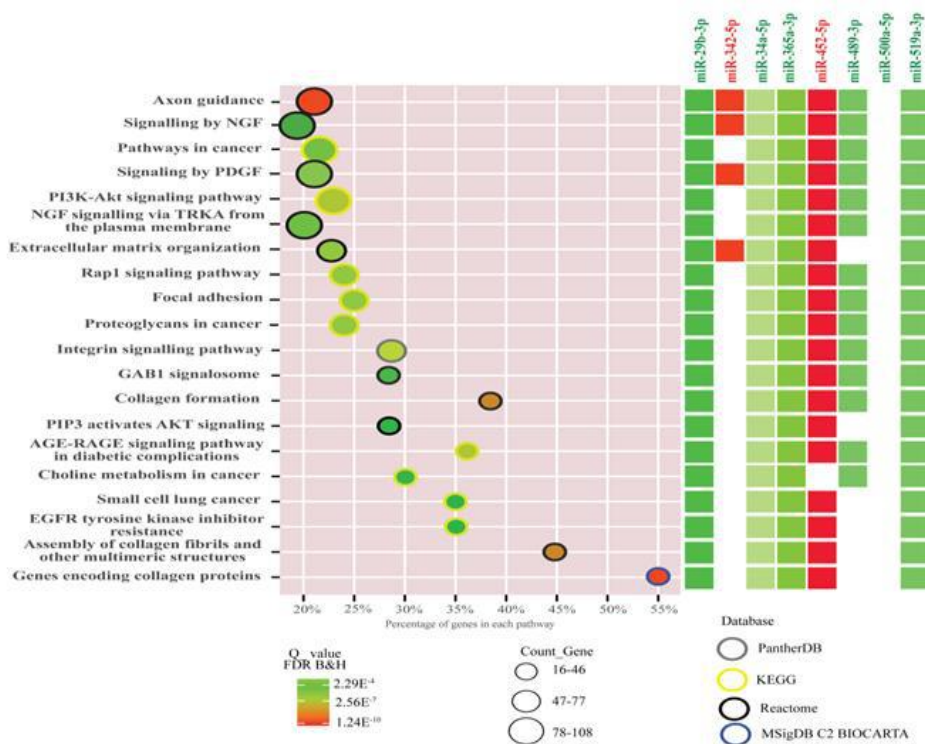
Os dados da análise de predição demonstraram vários genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados na DC, os genes-alvo estão detalhados nos **anexos 6 e 7**. Após a análise de enriquecimento, as vias biológicas potencialmente envolvidas na DC baseadas nos genes-alvo dos miRNAs alterados estão representadas na **Figura 2a e b**.

Vias Moleculares: Pacientes com DC Respondedores ao Tratamento vs. controles



A

Vias Moleculares: Pacientes com DC Não Respondedores ao Tratamento vs. controles



B

Figura 2. Vias moleculares enriquecidas, reguladas pelos genes-alvo de miRNAs alterados no plasma de pacientes com DC: Respondedores (a) e Não Respondedores (b) em comparação com indivíduos saudáveis.

## ***CAPÍTULO 2.***

### **Características demográficas e clínicas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa**

Foram analisados 30 pacientes (16 mulheres e 14 homens), a idade média foi de 51,3 anos e a maioria (87%) dos pacientes se auto declarou como sendo da raça branca. Com relação ao tabagismo, 97% dos pacientes eram não fumantes ou ex-fumantes e 3% eram tabagistas. Quanto ao consumo de álcool, 87% dos pacientes não consumiam bebidas alcoólicas e 13% declararam consumir álcool socialmente. Quanto ao tratamento, 33% dos pacientes estavam em uso de aminossalicílicos, 27% com terapia biológica e 13% sem tratamento no momento da coleta.

De acordo com a localização e extensão da doença, 70% dos pacientes tiveram comprometimento de todo o cólon. De acordo com o escore de Mayo, 27% apresentavam atividade moderada e nenhum paciente apresentava atividade grave da doença. Na **Tabela 3** estão descritas as características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de RCU as características clínicas dos pacientes respondedores e não respondedores, vinte e um (70%) dos pacientes com RCU foram considerados respondedores ao tratamento.

**Tabela 3:** Características demográficas e clínicas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa.

<b>Retocolite Ulcerativa</b>	<b>N (%)</b>	<b>Respondedores n=21</b>	<b>Não respondedores n=9</b>
<b>Idade, média (DP)</b>	51,3		
Feminino	16 (53%)	12	4
Masculino	14 (47%)	9	5
<b>Etnia</b>			
Branco	26 (87%)	19	7
Pardo	3 (10%)	2	1
Negro	1 (3%)	-	1
<b>Etilismo</b>			
Sim	4 (13%)	3	1
Não	26 (87%)	18	8
<b>Tabagismo</b>			
Sim	1 (3%)	1	0
Não	29 (97%)	20	9
<b>Tratamento</b>			
Aminossalicílicos	10 (33%)	8	2
Imunomoduladores	8 (27%)	6	2
Terapia biológica	8 (27%)	3	5
Sem tratamento	4 (13%)	4	-
<b>Extensão da doença</b>			
Distal	1 (3%)	1	-
Hemicolite esquerda	8 (27%)	8	1
Pancolite	21 (70%)	14	8
<b>Escore de Mayo</b>			
Remissão	10 (33%)	8	2
Leve	12(40%)	10	2
Moderada	8 (27%)	3	5
Grave	-	-	-

## **Conjuntos distintos de miRNAs apresentam expressão desregulada no plasma de pacientes com Retocolite Ulcerativa, respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso.**

As análises foram realizadas para identificar os diferentes níveis de expressão dos miRNAs no plasma de pacientes com RCU, respondedores e não respondedores ao tratamento em comparação com indivíduos saudáveis.

Na análise de pacientes Respondedores ao tratamento foram identificados 19 miRNAs com expressão desregulada estatisticamente significativa ( $FC \geq 2$  e  $p < 0,05$ ), sendo 18 miRNAs com expressão diminuída (miR-150-5p, miR-486-3p, miR-425-5p, miR-532-5p, miR-451a, miR-25-3p, miR-122-5p, miR-486-5p, miR-139-3p, miR-16-5p, miR-215-5p, miR-92a-3p, miR-132-3p, miR-652-3p, miR-17-5p, miR-24-3p, miR-331-3p e miR-29a-3p) e um miRNA com expressão aumentada (miR-655-3p).

No plasma de pacientes não respondedores, foram identificados 5 miRNAs com expressão diminuída (miR-425-5p, miR-122-5p, miR-342-3p, miR-370-3p e miR-139-5p) e 3 miRNAs com expressão aumentada (miR-148a-3p, miR-148b-3p e miR-202-3p) **(Tabela 4).**

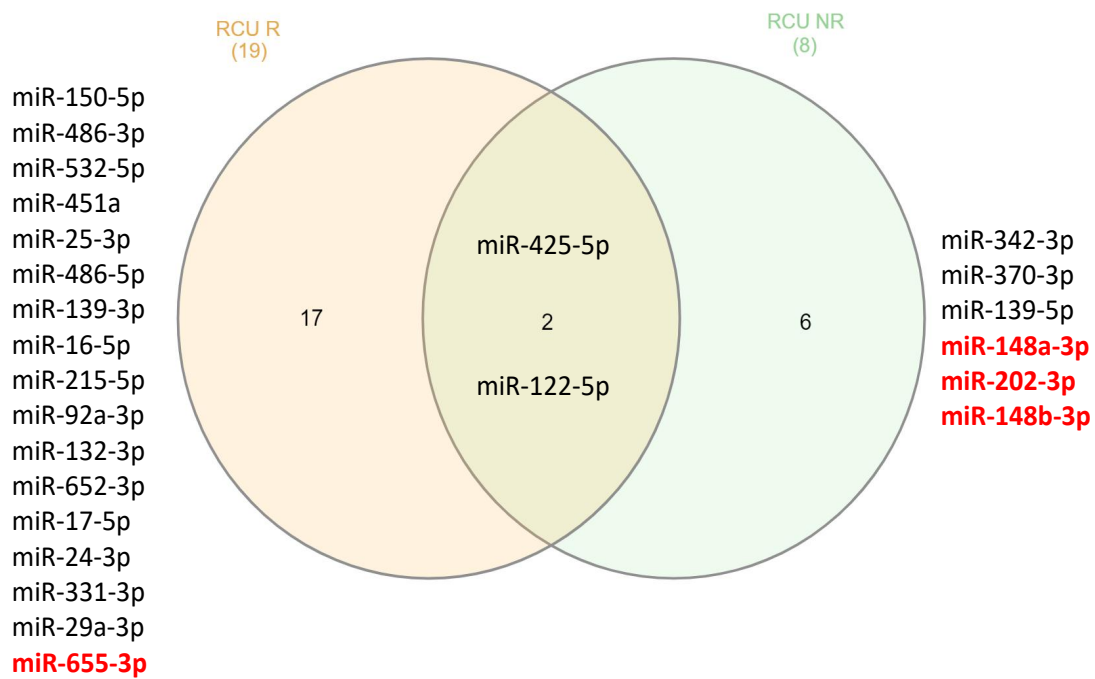
Na **Figura 3** comparamos os miRNAs com expressão aumentada e diminuída nos pacientes respondedores vs não respondedores da RCU. Identificamos 2 miRNAs circulantes (miR-425-5p e miR-122-5p) comuns a todos os pacientes, independente da resposta ao tratamento. Adicionalmente, foram identificados, 17 miRNAs exclusivos dos pacientes respondedores (miR-150-5p, miR-486-3p, miR-532-5p, miR-451a, miR-25-3p, miR-486-5p, miR-139-3p, miR-16-5p, miR-215-5p, miR-92a-3p, miR-132-3p, miR-652-3p, miR-17-5p, miR-24-3p, miR-331-3p, miR-29a-3p e miR-655-3p) e 6 miRNAs

exclusivos aos não respondedores (miR-342-3p, miR-370-3p, miR-139-5p, miR-148a-3p, miR-202-3p e miR-148b-3p).

**Tabela 4.** miRNAs significativamente desregulados no plasma de pacientes com RCU, respondedores e não respondedores ao tratamento, comparado com indivíduos saudáveis.

<b>Respondedores</b>				<b>Não respondedores</b>			
<b>Expressão diminuída</b>				<b>Expressão diminuída</b>			
<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p</b>	<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p</b>
miR-150-5p	0,041	-4,61	0,000	miR-425-5p	0,112	-3,16	0,000
miR-486-3p	0,051	-4,29	0,004	miR-122-5p	0,113	-3,15	0,003
miR-425-5p	0,093	-3,43	0,001	miR-342-3p	0,218	-2,20	0,012
miR-532-5p	0,103	-3,28	0,000	miR-370-3p	0,24	-2,06	0,008
miR-451a	0,107	-3,22	0,001	miR-139-5p	0,252	-1,99	0,000
miR-25-3p	0,115	-3,12	0,001				
miR-122-5p	0,118	-3,08	0,016				
miR-486-5p	0,124	-3,01	0,006				
miR-139-3p	0,124	-3,01	0,014				
miR-16-5p	0,134	-2,90	0,003				
miR-215-5p	0,15	-2,74	0,001				
miR-92a-3p	0,162	-2,63	0,003				
miR-132-3p	0,167	-2,58	0,002				
miR-652-3p	0,186	-2,43	0,006				
miR-17-5p	0,213	-2,23	0,004				
miR-24-3p	0,232	-2,11	0,006				
miR-331-3p	0,244	-2,04	0,011				
miR-29a-3p	0,247	-2,02	0,007				
<b>Expressão aumentada</b>				<b>Expressão aumentada</b>			
<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p</b>	<b>miRNAs</b>	<b>RQ</b>	<b>logFC</b>	<b>p</b>
miR-655-3p	5,383	2,4	0,010	miR-148a-3p	3,61	1,85	0,000
				miR-202-3p	3,694	1,89	0,000
				miR-148b-3p	4,059	2,02	0,001

RQ= valor da expressão do miRNA. LogFC=log de *foldchange*(valores negativos indicam expressão diminuída e valores positivos indicam expressão aumentada).Valor de *p* determinado pelo teste de ANOVA.

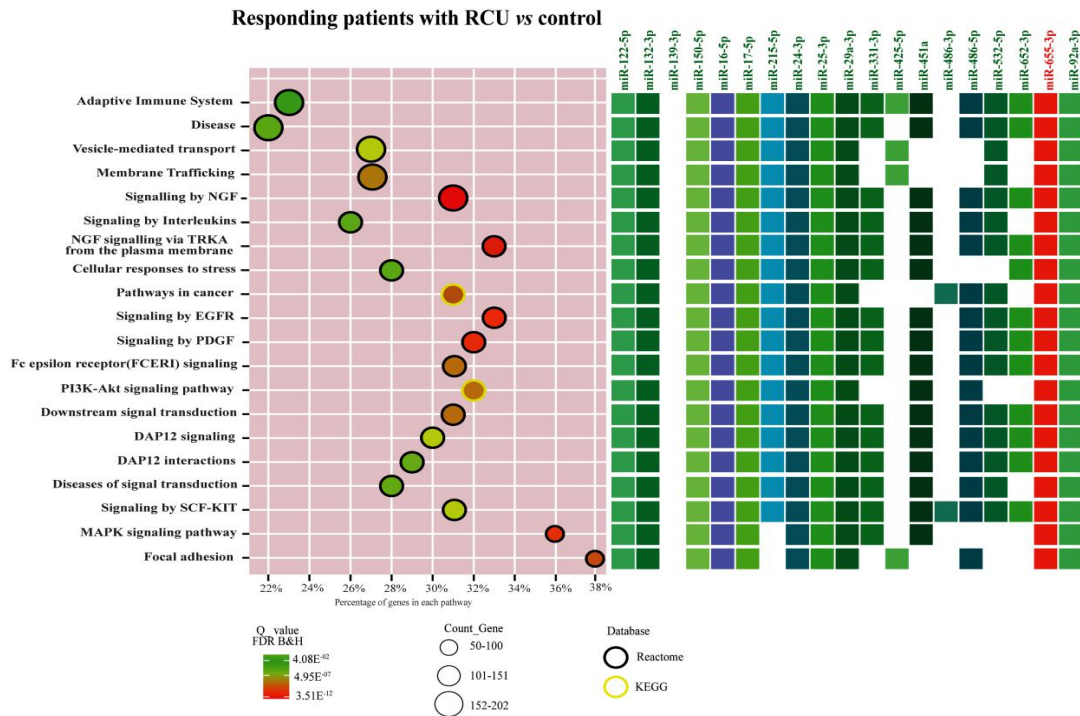


**Figura 3.** Diagrama de Venn ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com RCU, comuns e exclusivos aos pacientes respondedores vs não respondedores. Estão destacados em preto os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

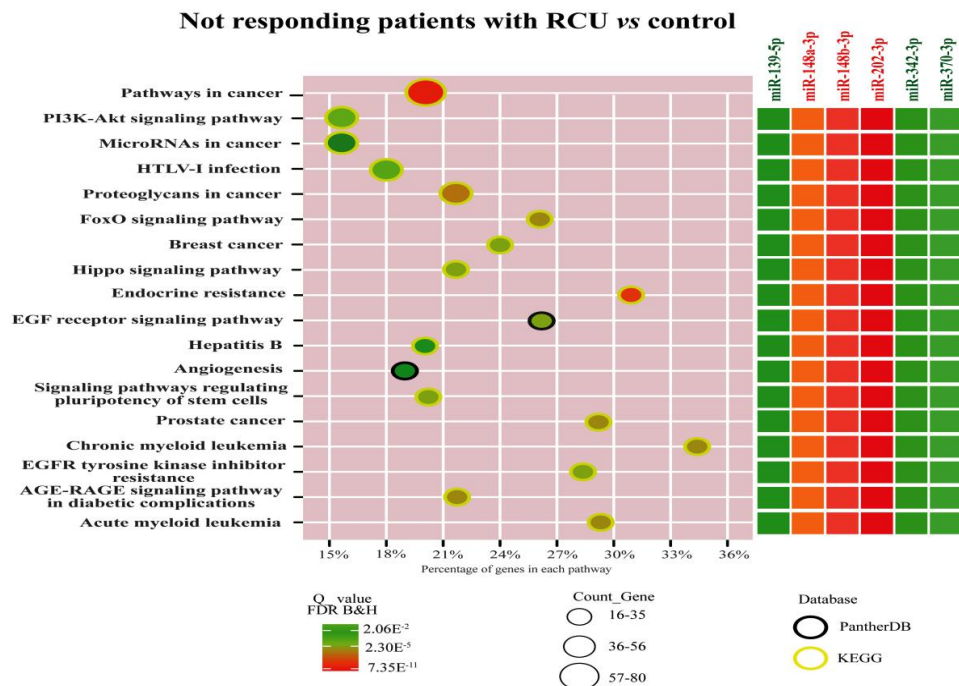
## **Identificação de genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares enriquecidas**

Os dados da análise de predição demonstraram vários genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados na RCU, estudando-os detalhados nos **anexos 8 e 9**. Após a análise de enriquecimento, as vias biológicas potencialmente envolvidas na RCU baseadas nos genes-alvo dos miRNAs alterados estão representadas na **Figura 4a e b**.

## Vias moleculares: Pacientes com RCU respondedores ao tratamento vs. controle



## Vias moleculares: Pacientes com RCU não respondedores ao tratamento vs. Controle



**Figura 4.** Vias moleculares enriquecidas, reguladas pelos genes-alvo de miRNAs alterados no plasma de pacientes com RCU: Respondedores (a) e Não Respondedores (b) em comparação com indivíduos saudáveis.

## *Discussão*

O efeito das alterações na expressão de miRNAs nas diferentes formas de DII ainda é pouco entendido. Na literatura, estudos têm sido realizados a fim de identificar alterações na expressão de miRNAs e a sua possível utilização no desenvolvimento de biomarcadores associados à DII (Quadro 1). Alguns destes estudos identificaram perfis de expressão de miRNAs no sangue periférico de pacientes com DII (38) (39), e sugerem sua utilidade potencial como biomarcadores não invasivos (38). O presente trabalho visou identificar alterações na expressão de miRNAs circulantes no plasma de pacientes com DC ou RCU, respondedores ou não respondedores aos tratamentos farmacológicos empregados.

### **1) Doença de Crohn**

A família do miR-200 contém cinco membros incluindo o miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 e miR-429 (50). Desses, o miR-200b se apresentou aumentado em pacientes com DC respondedores aos tratamentos farmacológicos (50). Diversas evidências sugerem que os membros dessa família estejam envolvidos na metástase do câncer, além de estarem altamente correlacionados com a transição epitelial-mesenquimal (EMT) (51). A EMT é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão e resistência a apoptose são potencializadas. A EMT é essencial para vários processos de desenvolvimento, incluindo a formação da mesoderme, formação de tubos neurais além de auxiliar na cicatrização de feridas, na fibrose de órgãos e no início de metástases durante a progressão do câncer (52)(53).

Wellner e cols. (54) relatam que o miR-200b atua como supressor de tumor sendo um regulador crítico de EMT, manutenção das células-tronco tumorais, apoptose e quimiossensibilidade ao câncer. Em CCR a expressão do miR-200b está diminuída

(55) indicando seu papel no desenvolvimento desta neoplasia. Além do CCR, sua expressão diminuída também foi relatada em outros tipos de câncer, incluindo câncer gástrico (56), câncer de nasofaringe (57) e câncer de pulmão (58). Além de indicar um possível mecanismo pelo qual esses pacientes estão respondendo ao tratamento, sua expressão aumentada pode ser considerada um fator protetor no desenvolvimento de tumores (54).

Apesar do efeito protetor em relação ao desenvolvimento de tumores, Chen e cols. (59) mostraram que tanto o miR-200a quanto o miR-200b estão relacionados ao desenvolvimento da fibrose intestinal, uma das principais complicações da DC. A expressão do miR-200b foi induzida pelo fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) proteína que controla o crescimento, a proliferação, a diferenciação e a apoptose (59), apresentando-se aumentada no grupo com fibrose quando comparado ao grupo sem fibrose e também quando comparado com os indivíduos saudáveis. Dessa forma, os autores sugeriram que a expressão do miR-200b no soro poderia ser um biomarcador positivo para diagnóstico de fibrose DC. Comparando com os nossos dados, a expressão aumentada de miRNAs no plasma de pacientes com DC e respondedores ao tratamento poderia sugerir que estes pacientes estariam mais sujeitos ao desenvolvimento de fibrose. Uma possibilidade seria o acompanhamento destes pacientes por um tempo maior de seguimento, a fim de analisar a evolução das lesões para fibrose.

Outra família de miRNAs bem caracterizada na literatura, a let-7, é evolutivamente conservada desde as bactérias até os seres humanos; estes miRNAs podem atuar controlando genes com funções anti-inflamatórias, incluindo fatores pró-inflamatórios como IL-6 e IL-13. Além de estarem intimamente relacionados às funções endoteliais como apoptose e angiogênese (60).

Kumar e cols. (61) demonstraram que os membros da família let-7 têm a capacidade de inibir a expressão de IL-13 e representam um importante mecanismo regulatório modulando a expressão de IL-13 em células secretoras de IL-13 além de modularem a resposta TH2 (61). Já o aumento na expressão do let-7f-5p foi relacionado à uma diminuição na produção de IL-1 $\beta$ e componentes do NLRP3 inflamassoma, levando à redução da inflamação tanto *in vitro* quanto *in vivo* (62).

Estudos recentes demonstraram um papel dos miRNAs let-7na regulação da apoptose pela inibição das proteínas Fas e Bcl-x1 (63)(64)(65) as quais modulam o mecanismo anti-apoptóicas (66).

Fujiokae cols. (67) investigaram os níveis séricos de vários miRNA durante a terapia de indução pelo infliximabe (IFX) nas semanas 0 e 6 de indução. Encontrando níveis significativamente aumentados de cinco miRNAs, sendo dois deles da família let-7 (let - 7d e let - 7e). Neste estudo foi demonstrado que em função da diminuição na expressão Bax (efeito pró-apoptóicos) com o aumento simultâneo do Bcl-x1 (efeito anti-apoptóicas) ocorreu uma diminuição da apoptose na DC. Os autores concluíram que o let-7 tem a capacidade de restaurar o equilíbrio entre Bcl-x1/Bax e auxiliar no efeito pró-apoptóico do IFX, restaurando à apoptose nas células inflamatórias e resultando em uma eficácia terapêutica por IFX.

Este achado, em especial em relação ao let-7, associado à resposta positiva ao tratamento com IFX, também foi observado em nosso estudo, naqueles pacientes com DC que responderam ao tratamento, aventando-se assim a possibilidade de este ser um marcador positivo associado à resposta com Anti-TNF. Para o nosso conhecimento, este foi o único trabalho na literatura que faz a correlação entre resposta ao tratamento e expressão de miRNAs específicos, em pacientes com DC tratados com IFX.

Pouco se sabe sobre o papel do miR-190a-5p em doenças humanas. Estudos experimentais relataram uma associação clínica entre alterações na expressão do miR-190e o desenvolvimento e progressão do câncer. (68) A regulação negativa deste miRNA foi encontrada no câncer de próstata, câncer de mama (69) e câncer retal (70). Adicionalmente, Almog e col. (71) mostraram que o aumento da expressão do miR-190a levou à inibição do crescimento de células tumorais de glioblastoma e osteossarcoma. Em nosso estudo, o miR-190-5p estava com expressão aumentada, o que poderia sugerir um fator protetor para o desenvolvimento de câncer nos pacientes que responderam ao tratamento.

Alterações na expressão do miR-452-5p foram relatadas na literatura em vários tipos de câncer, principalmente no câncer gástrico (72). Xiaobo e col (73), identificaram que o miR-452 estava altamente expresso em células gástricas tumorais. Nossos resultados mostraram a expressão aumentada do miR-452-5p em pacientes que não responderam ao tratamento, constituindo um potencial fator para o desenvolvimento de neoplasia, principalmente nos pacientes com DC, os quais geralmente apresentam o trato gástrico superior afetado. Apenas um dos nossos pacientes com DC apresentou este tipo de alteração no trato gastrointestinal superior afetado (L4-TGI superior).

O miR-342-5p está envolvido na ativação de macrófagos e secreção de citocinas durante a aterosclerose (74). Sua expressão aumentada ativa os macrófagos que por sua vez estimulam células pró-inflamatórias, promovendo a inflamação e aumentando o estresse nitro-oxidativo na aterosclerose (75).

Os pacientes não-respondedores ao tratamento provavelmente apresentam uma maior resposta inflamatória, devido à ativação de macrófagos e secreção de citocinas, em função do aumento de expressão de miRNAs incluindo o miR-342-5p.

Nossos resultados da análise de predição de genes-alvo dos miRNAs alterados em DC mostraram algumas vias moleculares potencialmente relevantes ao desenvolvimento desta forma de DII. Entre as vias identificadas, ressaltamos a via molecular de formação do colágeno. Achados recentes sugerem que o aumento da produção de colágeno pode ser crucial a mecanismos de promoção da fibrose intestinal, bem como de desenvolvimento de estenose e obstrução intestinal (76). A proteína do colágeno tipo III, codificada pelo gene *COL3A1*, é um componente estrutural importante em órgãos ocos, como grandes vasos sanguíneos, útero e intestino (77). Ballengee e col. (78) estudaram crianças com DC com característica inflamatória (fenótipo B1) e que posteriormente evoluíram para estenose (fenótipo B2); estes autores analisaram se os níveis plasmáticos de COL3A1 (no fenótipo B2) estariam aumentados no momento do diagnóstico, comparado com crianças que permaneceram com características inflamatórias (fenótipo B1). Os resultados evidenciaram que as concentrações plasmáticas basais de COL3A1 aumentam significativamente em indivíduos diagnosticados como DC inflamatória e que desenvolveram estenose (B2), quando comparados com indivíduos que permaneceram com o fenótipo B1 e indivíduos saudáveis (controles). Estes resultados podem ser corroborados pelas características da patogênese que incluem o excesso de deposição de colágeno, levando à fibrose tecidual. O COL3A1 não aumentou nos indivíduos que apresentaram fibrose (B2) ao diagnóstico em comparação aos pacientes (B1) e controles. Isso pode ser devido à ocorrência de cicatrização intestinal. Embora a fibrose intestinal possa não ser evitável, o COL3A1 poderia ser usado como outra ferramenta para estratificar os pacientes no momento do diagnóstico e estabelecer expectativas para o curso da doença. Identificar pacientes antes do desenvolvimento de uma estenose clínica e, em seguida, adaptar a terapia anti-fibrótica para prevenir a doença, é o futuro do tratamento da DC. Portanto, COL3A1

pode ser útil para detectar fibrose ativa precoce, antes de se formar uma estenose mais evidente clinicamente.

## 2) Retocolite Ulcerativa

Harazono e cols. Harazono e cols. (79) identificaram o miR-655 como um miRNA supressor de EMT. Desempenhando um papel crucial em muitos estágios de desenvolvimento e também na progressão tumoral. No carcinoma espinocelular do esôfago, a expressão aumentada do miR-655 demonstrou uma associação significativa com melhor prognóstico. Além disso, *ZEB1* e *TGFBR2*, que são componentes importantes da via de sinalização do TGF- $\beta$ , foram caracterizados como genes-alvo diretos do miR-655. Identificamos o miR-655-3p no plasma dos pacientes que responderam ao tratamento e sugerimos que a expressão aumentada deste miRNA pode constituir um fator favorável, pois nenhum dos nossos pacientes apresentou diagnóstico de displasia.

O miR-148a está envolvido em uma série de processos biológicos, incluindo a diferenciação celular e o desenvolvimento (80). Porntner e cols. (81) demonstraram que a expressão do miR-148a aumentou após a ativação de células pré-B, promoveu a diferenciação de células B ativadas em células plasmáticas e melhorou a viabilidade de células plasmáticas, pela inibição dos fatores de transcrição BACH2 e MITF e fatores pró-apoptóticos BIM e PTEN. Outros estudos relataram um papel importante do miR-148a em alguns tipos de tumores, incluindo o colangiocarcinoma e os cânceres de próstata, esôfago e cólon (82)(82)(83)(84).

O miR-202-3p tem como papel a supressão de tumores, podendo inibir a proliferação celular e a tumorigênese (85). Zhou e cols. identificaram que o miR-202-

3p está envolvido no processo de fibrose em pacientes com esclerose sistêmica. Nesse estudo, a expressão aumentada do miR-202-3p está correlacionada com o aumento de colágeno nos fibroblastos, causando inibição da expressão de MMP1 (enzima que decompõe os colágenos tipo I, II e III). Esse resultado sugere que o miR-202-3p pode ter um papel na promoção da fibrose pela inibição de MMP1. De maneira interessante, o miR-202-3p estava entre os miRNAs com expressão mais pronunciada em tumores neuroendócrinos gástricos e foi sugerido como desempenhar um papel importante na progressão destas neoplasias por meio da regulação do gene *DUSP1* (86). Os dados deste estudo vêm de encontro aos nossos achados que mostraram a superexpressão do miR-202-3p no plasma de pacientes com RCU e não respondedores ao tratamento. Uma hipótese é que altos níveis de expressão deste miRNA, detectado no plasma, poderia constituir um biomarcador de doença mais agressiva.

Entre os genes-alvo preditos identificados em nosso estudo (Anexos 8 e 9), estão genes envolvidos na regulação da resposta imune, estresse oxidativo e em vias de sinalização como a via do EGFR (receptor de fator de crescimento), os quais são processos e mecanismos comumente alterados em doenças crônico-degenerativas como o câncer. De acordo com os nossos dados e análise da literatura, tais vias estão relacionadas ao desenvolvimento do CCR em pacientes com RCU. De fato, o desenvolvimento do CCR está associado a alterações moleculares e fenotípicas também presentes na RCU (87). Além disso, ao aumento da permeabilidade da barreira epitelial da mucosa intestinal, relacionado com o estresse oxidativo (88)(89). Um dos principais mecanismos que liga a inflamação às alterações genéticas pré-neoplásicas é o estresse oxidativo, produzido principalmente por células inflamatórias como os macrófagos e granulócitos (90) e a liberação de uma cascata de mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ . Adicionalmente, processos frequentemente alterados durante a

tumorigênese incluem vias de sinalização como a do EGFR (89) (89), que desempenha um papel importante na dinâmica de células epiteliais, ativando outras vias de sinalização envolvidas na modulação da proliferação celular, angiogênese, diferenciação, progressão do ciclo celular e apoptose (91).

Embora encontramos algumas divergências entre os nossos resultados e alguns dados da literatura, constatamos que existem alguns fatores que devem ser considerados, especialmente: a) diferenças inerentes ao tipo de amostra e b) a existência de poucos estudos focados na análise de expressão de miRNAs em relação à resposta ao tratamento. Ressaltamos que o nosso trabalho contribuiu para a identificação de miRNAs ainda não relatados em DII, os quais podem constituir achados característicos de pacientes de diferentes regiões do mundo.

Os miRNAs desregulados identificados em nosso estudo indicam a complexidade de alterações em processos biológicos potencialmente associados com mecanismos das DIIs, as quais apresentam comportamentos biológicos e manifestações clínicas diferentes. Embora nosso estudo tenha sido limitado em relação ao tamanho amostral, os dados mostram que há um conjunto específico de miRNAs que estão desregulados no plasma de pacientes com DC e RCU. Além disso, alguns miRNAs identificados em nosso estudo ainda não foram relatados na literatura (de acordo com pesquisa na base de dados PubMed, atualizada aos 06 de Janeiro de 2020).

As limitações do estudo foram o número limitado de amostras analisadas e por constituir um estudo de centro único. A expansão dos nossos dados para um estudo multicêntrico no Brasil, incluindo um grande número de amostras, é essencial para a validação dos miRNAs identificados como biomarcadores na DII. Os miRNAs identificados podem ser úteis para o desenvolvimento futuro de novas estratégias

diagnósticas, contribuindo para o monitoramento e a melhoria do tratamento dos pacientes com DC e RCU.

## ***Conclusões***

- Nossos resultados mostraram que um conjunto específico de miRNAs (let-7f-5p, miR-200b-3p, miR-190a-5p, miR-452-5p, miR-342-5p, miR-655-3p, miR-148a-3p, miR-148b-3p e miR-202-3p) está com expressão desregulada no plasma de pacientes com DC e RCU;
- A expressão de miRNAs foi correlacionada com a resposta ao tratamento nas diferentes formas da doença (pacientes respondedores *vs* não respondedores). Os miRNAs com expressão aumentada na DC (let-7f-5p, miR-200b-3p, miR-190a-5p, miR-452-5p e miR-342-5p) e na RCU (miR-655-3p, miR-148a-3p, miR-148b-3p e miR-202-3p) foram considerados potencialmente relevantes para uso clínico (futuro), devido a sua detecção apenas no plasma dos pacientes e não nos indivíduos sem doença.
- Os miRNAs identificados como alterados modulam uma ampla gama de genes-alvo, os quais, por sua vez, regulam vias moleculares potencialmente associadas com as diferentes formas da doença.

## *Referências bibliográficas*

1. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006.
2. Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011.
3. Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: Reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2008.
4. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: The ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*. 2014.
5. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017.
6. Gasparini RG, Sasaki LY, Saad-Hossne R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol*. 2018.
7. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004.
8. Victoria CR, Sasaki LY, Nunes HRDC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2009.
9. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011.
10. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2010.
11. Sands BE, Winston BD, Salzberg B, Safdi M, Barish C, Wruble L, et al. Randomized, controlled trial of recombinant human interleukin-11 in patients with active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002.
12. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009.
13. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006.
14. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007.
15. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007.
16. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut*. 2001.
17. Malagelada JR, Bazzoli F, Boeckxstaens G, De Looze D, Fried M, Kahrilas P, et

- al. World gastroenterology organisation global guidelines. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2015.
18. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: The emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*. 2013.
  19. Duttagupta R, DiRienzo S, Jiang R, Bowers J, Gollub J, Kao J, et al. Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for Ulcerative Colitis. *PLoS One*. 2012.
  20. Leva G Di, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. 2006.
  21. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006.
  22. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005.
  23. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019.
  24. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2 $\alpha$ . *Gastroenterology*. 2008.
  25. Sohn JJ, Schetter AJ, Yfantis HG, Ridnour LA, Horikawa I, Khan MA, et al. Macrophages, Nitric Oxide and microRNAs Are Associated with DNA Damage Response Pathway and Senescence in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2012.
  26. Danese S. Immune and nonimmune components orchestrate the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011.
  27. Chen P, Li Y, Li L, Yu Q, Chao K, Zhou G, et al. Circulating microRNA146b-5p is superior to C-reactive protein as a novel biomarker for monitoring inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019.
  28. Schönauen K, Le N, Von Arnim U, Schulz C, Malfertheiner P, Link A. Circulating and fecal microRNAs as biomarkers for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2018.
  29. Sun CM, Wu J, Zhang H, Shi G, Chen ZT. Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2017.
  30. Oikonomopoulos A, Polytaichou C, Joshi S, Hommes DW, Iliopoulos D. Identification of Circulating MicroRNA Signatures in Crohn's Disease Using the Nanostring nCounter Technology. *Inflamm Bowel Dis*. 2016.

31. Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M, et al. Circulating MicroRNA223 is a new biomarker for inflammatory bowel disease. *Med (United States)*. 2016.
32. Polytarchou C, Oikonomopoulos A, Mahurkar S, Touroutoglou A, Koukos G, Hommes DW, et al. Assessment of circulating MicroRNAs for the diagnosis and disease activity evaluation in patients with ulcerative colitis by using the nanostring technology. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.
33. Jensen MD, Andersen RF, Christensen H, Nathan T, Kjeldsen J, Madsen JS. Circulating microRNAs as biomarkers of adult Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015.
34. Lewis A, Mehta S, Hanna LN, Rogalski LA, Jeffery R, Nijhuis A, et al. Low serum levels of microRNA-19 are associated with a stricturing Crohn's disease phenotype. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.
35. Krissansen GW, Yang Y, McQueen FM, Leung E, Peek D, Chan YC, et al. Overexpression of miR-595 and miR-1246 in the sera of patients with active forms of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.
36. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohn's Colitis*. 2014.
37. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2012.
38. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011.
39. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, et al. Peripheral blood MicroRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011.
40. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's Disease Activity Index: National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976.
41. S SM, Satsangi J, Ahmad T, D AI, N BC, R BS, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie JID - 8807867*. 909.
42. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005.
43. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016.

44. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009.
45. Peart MJ, Smyth GK, Van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005.
46. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay M, et al. MirDIP 4.1 - Integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.* 2018.
47. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, et al. MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018.
48. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* 2009.
49. Heberle H, Meirelles VG, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics.* 2015.
50. Korpál M, Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biology.* 2008.
51. Feng B, Wang R, Chen LB. Review of MiR-200b and cancer chemosensitivity. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2012.
52. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. *Cell.* 2016.
53. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009.
54. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009.
55. He X, Dong Y, Wu CW, Zhao Z, Ng SSM, Chan FKL, et al. MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. *Mol Med.* 2012.
56. Gao C, Zhang Z, Liu W, Xiao S, Gu W, Lu H. Reduced MicroRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. *Cancer.* 2010.
57. Alajez NM, Lenarduzzi M, Ito E, Hui ABY, Shi W, Bruce J, et al. miR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res.* 2011.
58. Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, et al. miR-218 on the genomic loss region of chromosome 4p15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer. *Int J Oncol.* 2011.

59. Chen Y, Ge W, Xu L, Qu C, Zhu M, Zhang W, et al. miR-200b is involved in intestinal fibrosis of Crohn's disease. *Int J Mol Med*. 2012.
60. Lin Z, Ge J, Wang Z, Ren J, Wang X, Xiong H, et al. Let-7e modulates the inflammatory response in vascular endothelial cells through ceRNA crosstalk. *Sci Rep*. 2017.
61. Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A, Agrawal A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011.
62. Tan W, Gu Z, Leng J, Zou Xiaodong, Chen H, Min F, et al. Let-7f-5p ameliorates inflammation by targeting NLRP3 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother*. 2019.
63. Wang S, Tang Y, Cui H, Zhao X, Luo X, Pan W, et al. Let-7/miR-98 regulate Fas and Fas-mediated apoptosis. *Genes Immun*. 2011.
64. Geng L, Zhu B, Dai BH, Sui CJ, Xu F, Kan T, et al. A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011.
65. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010.
66. Ten Hove T, Van Montfrans C, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJH. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*. 2002.
67. Fujioka S, Nakamichi I, Esaki M, Asano K, Matsumoto T, Kitazono T. Serum microRNA levels in patients with Crohn's disease during induction therapy by infliximab. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014.
68. Yu Y, Cao XC. MiR-190-5p in human diseases. *Cancer Cell International*. 2019.
69. Xu S, Wang T, Song W, Jiang T, Zhang F, Yin Y, et al. The inhibitory effects of AR/miR-190a/YB-1 negative feedback loop on prostate cancer and underlying mechanism. *Sci Rep*. 2015.
70. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Søkilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome - MicroRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clin Cancer Res*. 2012.
71. Almog N, Briggs C, Beheshti A, Ma L, Wilkie KP, Rietman E, et al. Transcriptional changes induced by the tumor dormancy-associated microRNA-190. *Transcription*. 2013.
72. MiR-452-5p may serve as an oncogene in colorectal cancer through targeting CDKN1B: a study based on bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter assay. *Int J Clin Exp Med*. 2019.
73. He X, Shu Y. miR-452 promotes the development of gastric cancer via targeting

- EPB41L3. *Pathol - Res Pract*. 2019.
74. Ahmadi R, Heidarian E, Fadaei R, Moradi N, Malek M, Fallah S. MiR-342-5p expression levels in coronary artery disease patients and its association with inflammatory cytokines. *Clin Lab*. 2018.
  75. Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014.
  76. Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: Cellular mediators and animal models. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2000.
  77. Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*. 2019.
  78. Ballengee CR, Stidham RW, Liu C, Kim MO, Prince J, Mondal K, et al. Association Between Plasma Level of Collagen Type III Alpha 1 Chain and Development of Strictures in Pediatric Patients With Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019.
  79. Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, et al. miR-655 Is an EMT-Suppressive MicroRNA Targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*. 2013.
  80. Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The role of Mir-148a in cancer. *Journal of Cancer*. 2016.
  81. Porstner M, Winkelmann R, Daum P, Schmid J, Pracht K, Côte-Real J, et al. MiR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2. *Eur J Immunol*. 2015.
  82. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg*. 2010.
  83. Hummel R, Watson DI, Smith C, Kist J, Michael MZ, Haier J, et al. Mir-148a Improves Response to Chemotherapy in Sensitive and Resistant Oesophageal Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Cells. *J Gastrointest Surg*. 2011.
  84. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.
  85. Shi C, Wu L, Lin W, Cai Y, Zhang Y, Hu B, et al. MiR-202-3p regulates interleukin-1 $\beta$ -induced expression of matrix metalloproteinase 1 in human nucleus pulposus. *Gene*. 2019;.
  86. Dou D, Shi YF, Liu Q, Luo J, Liu JX, Liu M, et al. Hsa-miR-202-3p, up-regulated in type 1 gastric neuroendocrine neoplasms, may target DUSP1. *World J Gastroenterol*. 2018.
  87. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: An interface

- between health and disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2003.
88. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 2002.
  89. Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ, Keshavarzian A. Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cell line: Role of the microtubule cytoskeleton. *Free Radic Biol Med*. 2000.
  90. Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res*. 2009;
  91. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control*. 2007.

## *Anexos*

## Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**PROJETO: “Expressão de microRNAs Circulantes em Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa”**

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_  
RG HC \_\_\_\_\_  
Documento de identidade n.: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Número: \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
CEP: \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_

#### II. OBJETIVOS DO ESTUDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa, pois você foi diagnosticado como tendo uma Doença Inflamatória Intestinal (DII), ou seja retocolite ou doença de Crohn. O objetivo deste estudo é a identificar se existem características genéticas destas doenças que possam estar relacionadas com a sua ocorrência. Desta forma buscamos identificar se você apresenta nos seus genes (proteínas) características que possam estar relacionados à sua doença. Será realizado uma avaliação de moléculas de microRNAs (proteínas) circulantes presentes no sangue. Os dados obtidos poderão contribuir para se estabelecer as características da doença, ou seja, evolução, prognóstico, quadro clínico e até novas abordagens de tratamento.

#### III. PROCEDIMENTOS

Após a assinatura deste termo, você será encaminhado ao laboratório para a retirada da amostra de sangue. No laboratório serão retirados 10 ml de sangue (5 ml em um tubo roxo e 5 ml em um tubo vermelho) através de uma picada com agulha na veia do braço. O sangue será identificado e enviado ao laboratório para análise. No laboratório, o sangue passará por uma máquina que irá identificar quais tipos de moléculas de microRNAs estão alterados, produzindo assim, um conjunto de dados que podem estar relacionadas com a Doença Inflamatória Intestinal e os seus subtipos de Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. Esta quantidade de sangue coletado é muito pequena e esta coleta é igual a utilizada para colher seu sangue para o acompanhamento da doença.

Os resultados deste estudo também serão utilizados para apresentação de artigos e trabalhos científicos. Na divulgação dos resultados não serão divulgados os nomes ou qualquer informação que possa identificar os participantes da pesquisa.

Também solicitamos sua autorização para guardar parte da amostra de sangue que não será utilizada nesta pesquisa. Esta amostra será guardada no Laboratório de Biologia Molecular da FMB (neogense), e poderá ser utilizada em pesquisas futuras. Todas as pesquisas são aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa antes do seu início, e se necessário solicitaremos sua autorização para uso.

#### IV - BENEFÍCIOS

A participação neste estudo poderá trazer benefícios para você ou para os membros de sua família diretamente e poderá ajudar os médicos e pesquisadores a compreender como a doença se desenvolve.

#### V - RISCOS

Os riscos associados com sua participação nesse estudo são um desconforto ou dor no local da picada para retirada do sangue.

#### VI – ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada por um Comitê de Ética. A confidencialidade das suas informações será mantida. Apenas as pessoas envolvidas diretamente nesse estudo e o Comitê de Ética em Pesquisa poderão ter acesso às informações se necessário. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicar o tratamento do seu familiar.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a Carina ou Dr. Rogério no telefone 3880-1438. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo telefone 3880-1608.

DECLARO QUE FUI ESCLARECIDO: sobre os procedimentos, riscos e benefícios sobre este estudo; que tenho liberdade em retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade do tratamento do meu familiar; que não haverá remuneração financeira para este estudo; sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial.

( ) concordo participar do estudo

( ) concordo com a guarda da amostra de sangue

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de

Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 38801608 ou 38801609

Botucatu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
(Paciente)

\_\_\_\_\_  
(Pesquisador)

Carina de Fátima de Síbia Faculdade de Medicina de Botucatu Rubião Júnior, 18618970 - Botucatu, SP - Brasil Telefone: (14) 99646-2505 carinasibia@gmail.com	Rogério Saad Hossne Faculdade de Medicina de Botucatu. Departamento de Cirurgia e Ortopedia. Rubião Júnior 18618970 - Botucatu, SP - Brasil Telefone: (14) 38116269 saad@fmb.unesp.br
--	--

## Anexo 2. Índice de atividade da doença de Crohn (CDAI)

### Índice de Atividade Inflamatória da doença de Crohn (CDAI“Crohn’s Disease Activity Index” (Best et al., 1976)

	Multiplicado por
1) Número de evacuações líquidas na última semana Considerar a soma total dos dados individuais da última semana	2
2) Dor abdominal (ausente = 0; leve = 1; moderada = 2; grave = 3 Considerar a soma total dos dados individuais da última semana	5
3) Estado geral (ótimo = 0; bom = 1; regular = 2; mau = 3; péssimo = 4) 4) Considerar a soma total dos dados individuais da última semana	7
4) N ° de sintomas/sinais associados (alistar por categorias: a) Artralgia/Artrite; b) Irite/Uveíte; c) Eritema Nodoso/Pioderma gangrenoso/Aftas Orais; d) Fissura Anal, Fístula ou Abscesso; e) Outras Fístulas; f) Febre	20 (valor máximo = 120)
5) Consumo de antidiarréico (não = 0; Sim = 1)	30
6) Massa abdominal (ausente = 0; duvidosa = 2; bem definida = 5)	10
7) “Déficit”de hematócrito: homens: 47-Ht; mulheres: 42-Ht (diminuir em vez de somar no caso do Ht do paciente ser > do que o padrão)	6
8) Peso*: porcentagem abaixo do esperado (diminuir em vez de somar se o peso do paciente for maior que o esperado)	1

\*Peso esperado ou ideal = Altura (m)<sup>2</sup>x 25,5 = \_\_\_\_\_ Kg (homens),

Altura (m)<sup>2</sup>x 22,5 = \_\_\_\_\_ Kg (mulheres)

**Soma Total (CDAI):** ≤150: remissão, 150 – 250: discreta, 250 – 350: moderada, >350: grave.

**Anexo 3.** Classificação da Extensão da Doença de Crohn (Montreal, 2005).

1. Idade do diagnóstico: <input type="checkbox"/> A1 ≤ 16 anos <input type="checkbox"/> A2 entre 17 e 40 anos <input type="checkbox"/> A3 > 40 anos
2. Localização: <input type="checkbox"/> L1 - Ileal <input type="checkbox"/> L2 - Colônica <input type="checkbox"/> L3 - Ileocólica <input type="checkbox"/> L4 - Doença TGI superior isolada (modificador que pode ser adicionado a L1-L3 quando houver, concomitantemente, doença envolvendo o TGI superior)
3. Comportamento: <input type="checkbox"/> B1 – Não estenosante, não penetrante <input type="checkbox"/> B2 – Estenosante <input type="checkbox"/> B3 – Penetrante <input type="checkbox"/> P – doença perianal (é acrescentado a B1-B3 quando houver doença perianal concomitante)

#### Anexo 4. Escore de Mayo para Avaliação da Atividade da Retocolite Ulcerativa

	<b>Pontos</b>
<b>4 número de evacuações:</b> 0 – habitual do paciente 1 – 1 a 2 vezes além do habitual 2 – 3 a 4 vezes além do habitual 3 – 5 ou + vezes além do habitual	
<b>5 Presença de sangramento retal:</b> 0 – sem sangue visível 1 – estrias nas fezes em menos de metade das evacuações 2 – sangue vivo nas fezes na maioria das evacuações 3 – evacuação apenas com sangue	
<b>6 Achados endoscópicos:</b> 0 – normal ou doença inativa 1 – leve: eritema, diminuição do padrão vascular, discreta friabilidade 2 – moderada: eritema intenso, perda padrão vascular, friabilidade, erosões 3 – grave: sangramento espontâneo, ulceração	
<b>Avaliação global:</b> desconforto abdominal, bem-estar, PPS, exame físico 0 – normal 1 – doença discreta 2 – doença moderada 3 – doença grave	
<b>TOTAL de Pontos</b>	

A pontuação varia de 0 a 12 pontos, com índices mais elevados sugerindo doença mais grave. Cada paciente é considerado como seu próprio controle.

Remissão: 0 a 2 pontos

Atividade Discreta: 3 a 5 pontos

Atividade Moderada: 6 a 10 pontos

Atividade Grave: 11 e 12 pontos

**Anexo 5.** Classificação da Extensão da Doença de Retocolite Ulcerativa

<input type="checkbox"/> <i>RCU Distal</i>
<input type="checkbox"/> <i>RCU Esquerda</i>
<input type="checkbox"/> <i>Pancolite</i>

**Anexo 6.** Principais vias de sinalização significativas na DC em pacientes respondedores vs controle.

Via molecular	p	q ajustado Bonferroni	n° genes	n°total genes na via	genes-alvo participantes da via
Vesicle-mediated transport	7,502E-17	2,41 E-13	255	660	SYS1,FZD4,ADRB2,AP2A1,AP2B1,AP1G1,TBC1D14,AKT2,ULK1,RIC1,ANK2,ANK3,MCFD2,CNIH2,APP,DENND1A,ARCN1,ARF1,MADD,ARF3,ARF4,SCARF1,SPTBN4,ARL1,VAMP8,STX16,GBF1,RAB11A,SNAP23,NAPG,BICD1,SYNJ1,AP1S2,WASL,CALM1,CALM3,CALR,FCHO2,CBL,SEC22C,RABEP1,CD59,REPS2,CYTH3,CYTH1,COPS2,TRIP11,CHRM2,TRIP10,CD163,VAMP3,AP2M1,AP1S1,RAB9A,KIF3B,RAB3GAP2,CLTC,COL1A1,COL1A2,COL3A1,COL4A1,COL4A2,KIF23,VPS4B,GOSR1,CPD,SEC22B,KIF20B,NECAP1,TBC1D10B,SEC24C,GCC2,DYNLL2,CLINT1,USP6NL,CUX1,RAB33B,LDLRAP1,GAPVD1,DAB2,COG3,C2CD5,COPS7A,CHMP7,BLOC1S6,SNAP91,DENND4B,SEC16A,DYNC1I1,DYNC1LI2,DNM2,AKT3,GJC1,TMED7,ARPC5,ACTR3,ACTR2,SAR1B,CNIH1,DYNC1LI1,DCTN4,STX6,RAB9B,EPS15,STAM2,DENND4A,SNX9,SEC23A,SGIP1,CHMP5,VTA1,VPS54,RAB14,SEC22A,RAB6B,TGOLN2,ARFGAP2,EXOC5,CHMP3,TRAPPC3,KIF1C,GALNT1,GALNT2,DCTN5,VPS4A,RAB8B,SEC24A,GDI1,GDI2,GJA1,RAB10,MAN1A2,COPS8,RAB30,TOR1B,YWHAQ,GNS,GOLGA1,GOLGA4,KDEL2,GRB2,GRIA1,KIF3A,HIP1,SCOC,AGFG1,HSPA8,IGF2R,KIF2A,KIF5A,KIF5B,KLC1,VTI1A,LDLR,LMAN1,LNPEP,LRP1,LRP2,M6PR,MAN2A2,MAN2A1,RAB8A,STX18,RACGAP1,MYO1C,MYO5A,RAB12,DENND5B,NSF,TBC1D25,OCRL,DENND6A,SH3D19,PAFAH1B1,PAFAH1B2,PIK3C2A,RIN2,UBQLN1,SH3KBP1,PPP6C,PRKAA2,PRKAB2,MASP1,FNBP1L,TBC1D8B,TBC1D20,RAB1A,STX17,RAB5B,RAB13,RAC1,KIF26B,CHMP4B,VPS37B,TBC1D17,PPP6R3,SORT1,SBF1,MIA3,VPS37A,KIF21A,ITSN1,SH3GL2,KIF16B,AAK1,PPP6R1,TRAPPC8,MON1B,DENND4C,SLC2A4,EPN2,RAB3GAP1,RAB18,NAPB,RAB21,KIF21B,KIF1B,SPTBN1,SPTBN2,ST5,GGA3,STXBP3,SYT11,VAMP2,VAMP7,SYT1,ANKRD28,DENND5A,BICD2,PIP5K1C,TRAPPC10,TMF1,TSC1,TSG101,RABGAP1,COLEC12,COPS7B,TBC1D15,AP1S3,KLC2,YWHAB,YWHAG,YWHAH,YWHAZ,DENND2C,AGPAT3,LMAN2L,DENND1B,RAB7A,YIPF6,MAN1C1,RALGAPB,KLC4,SBF2,NAA30

Axon guidance	1,461E-27	4,682E-24	250	554	<p>ABL2,ADAM10,BRAP,AP2A1,AP2B1,SRGAP1,SEMA6A,ALCAM,CUL3,ANK2,ANK3,SEMA7A,PIK3R3,CNTNAP1,ITGA10,SHTN1,RHOA,SPTBN4,RHOB,RHOC,UNC5C,LAMTOR3,NUMB,IRS2,PEA15,IQGAP1,NRP2,KSR1,CDK5R1,ARHGEF7,CACNA1I,CACNA1C,CACNA1D,CACNB1,WASL,CACNB4,RPS6KA4,CALM1,COL6A6,KALRN,CALM3,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,SEMA5A,CDC42,RPS6KA5,AP2M1,CLTC,NGEF,RASAL2,COL4A1,ROCK2,COL4A2,COL4A3,COL4A5,CREB1,CRMP1,PLXNA4,RAPGEF2,DCC,ARHGEF11,DCX,SRGAP3,DLG4,DNM2,DPYSL2,DPYSL3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,ARPC5,ACTR3,ACTR2,NTN4,RASGRP1,EFNA1,EFNB1,EFNB2,AKAP9,PLXNC1,PSME3,PSMD14,EPHA1,EPHA3,EPHA4,EPHA5,EPHA7,EPHA8,EPHB1,EPHB3,EPHB4,ERBB3,ERBB4,EREG,SEMA3A,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,VAV3,FGFR1,FGFR2,CAP1,SEMA4D,FN1,GAB1,CHL1,GAP43,FRS2,RPS6KA6,GRB2,GRB7,GRB10,GRIN1,GRIN2A,ARHGAP35,DUSP10,HGF,NRG1,LYPLA2,HSPA8,IRS1,ITGA2,ITGA5,ITGAV,ITGB3,JAK1,KDR,KIT,KRAS,LAMC1,LIMK1,LIMK2,LYN,SPRED2,MARK3,MET,KITLG,MAP3K11,MMP2,GIT1,MSN,MYH9,MYO10,NCAM1,NEFL,NEO1,NF1,NRAS,NRCAM,PAK1,PAK2,PAK3,PAQR3,PDGFB,PDGFRA,PFN1,PFN2,PIK3CA,PIK3R1,PITPNA,PLCG1,PLXNA1,PLXNA2,PLXNB1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKCA,MAPK1,MAPK3,MAPK7,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,RAC1,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RDX,RET,ROBO1,ROBO2,SPRED1,ROCK1,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,SEMA6D,SCN1A,SCN1B,SCN2A,SCN3A,SCN4B,SCN8A,SCN9A,SDC2,SDCBP,ITSN1,SH3GL2,SIAH1,CNKSR2,ENAH,SCN3B,SOS1,SOS2,DOK5,SPTBN1,SPTBN2,NFASC,CLASP2,PLXND1,CLASP1,ARHGEF12,SRGAP2,PIP5K1C,TIAM1,DUSP16,RGMB,TRIO,TRPC1,VAV2,VCL,VEGFA,YES1,YWHAB,DPYSL5,PAK6,RGMA,ST8SIA4,PAK5,RASGEF1A,ST8SIA2</p>
Membrane Trafficking	6,679E-18	2,14E-14	244	614	<p>SYS1,FZD4,ADRB2,AP2A1,AP2B1,AP1G1,TBC1D14,AKT2,ULK1,RIC1,ANK2,ANK3,MCFD2,CNIH2,APP,DENND1A,ARCN1,ARF1,MADD,ARF3,ARF4,SPTBN4,ARL1,VAMP8,STX16,GBF1,RAB11A,SNAP23,NAPG,BICD1,SYNJ1,AP1S2,WASL,CALM1,CALM3,FCHO2,CBL,SEC22C,RABEP1,CD59,REPS2,CYTH3,CYTH1,COPS2,TRIP11,CHRHM2,TRIP10,VAMP3,AP2M1,AP1S1,RAB9A,KIF3B,RAB3GAP2,CLTC,KIF23,VPS4B,GOSR1,CPD,SEC22B,KIF20B,NECAP1,TBC1D10B,SEC24C,GCC2,DYNLL2,CLINT1,USP6NL,CUX1,RAB33B,LDLRAP1,GAPVD1,DAB2,COG3,C2CD5,COPS7A,CHMP7,BLOC1S6,SNAP91,DENND4B,SEC16A,DYNC1I1,DYNC1LI2,DNM2,AKT3,GJC1,TMED7,ARPC5,ACTR3,ACTR2,SAR1B,CNIH1,DYNC1LI1,DCTN4,STX6,RAB9B,EPS1</p>

5,STAM2,DENND4A,SNX9,SEC23A,SGIP1,CHMP5,VT A1,VPS54,RAB14,SEC22A,R AB6B,TGOLN2,ARFGAP2,EXOC5,CHMP3,TRAPPC3,KIF1C,GALNT1,GALNT2,DCT N5,VPS4A,RAB8B,SEC24A,GDI1,GDI2,GJA1,RAB10,MAN1A2,COPS8,RAB30,TOR1 B,YWHAQ,GNS,GOLGA1,GOLGA4,KDEL R2,GRB2,GRIA1,KIF3A,HIP1,SCOC,AGF G1,HSPA8,IGF2R,KIF2A,KIF5A,KIF5B,KLC1,VTI1A,LDLR,LMAN1,LNPEP,LRP2,M 6PR,MAN2A2,MAN2A1,RAB8A,STX18,RACGAP1,MYO1C,MYO5A,RAB12,DENND 5B,NSF,TBC1D25,OCRL,DENND6A,SH3D19,PAFAH1B1,PAFAH1B2,PIK3C2A,RIN2 ,UBQLN1,SH3KBP1,PPP6C,PRKAA2,PRKAB2,FNBP1L,TBC1D8B,TBC1D20,RAB1A ,STX17,RAB5B,RAB13,RAC1,KIF26B,CHMP4B,VPS37B,TBC1D17,PPP6R3,SORT1,S BF1,MIA3,VPS37A,KIF21A,ITSN1,SH3GL2,KIF16B,AAK1,PPP6R1,TRAPPC8,MON1 B,DENND4C,SLC2A4,EPN2,RAB3GAP1,RAB18,NAPB,RAB21,KIF21B,KIF1B,SPTB N1,SPTBN2,ST5,GGA3,STXBP3,SYT11,VAMP2,VAMP7,SYT1,ANKRD28,DENND5 A,BICD2,PIP5K1C,TRAPPC10,TMF1,TSC1,TSG101,RABGAP1,COPS7B,TBC1D15,A P1S3,KLC2,YWHAB,YWHAG,YWHAH,YWHAZ,DENND2C,AGPAT3,LMAN2L,DE NND1B,RAB7A,YIPF6,MAN1C1,RALGAPB,KLC4,SBF2,NAA30

Signalling by NGF

1,985E-20

6,36E-17

209

483

ABR,ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,BRAP,ADORA2A,AP2A1,AP2B1,PIP5K

1B,AKT2,PREX1,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,RHOA,SPTBN4,ARHGDI A,LAMTOR3,ATF 1,IRS2,PEA15,RIPK2,IQGAP1,KSR1,ARHGEF7,SQSTM1,CALM1,KALRN,CALM3,C AMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CASP3,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B, RPS6KA5,MAPKAPK2,CHUK,AP2M1,CLTC,NGEF,RASAL2,CREB1,CRK,CRKL,MA PK14,ARHGEF10,ARHGEF3,RAPGEF2,ARHGEF26,ARHGEF11,ARHGEF17,DLG4,D NM2,AKT3,BCL2L11,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8, DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,N ET1,FGD1,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,VAV3,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1, AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,RAPGEF1,GRIN1,GRIN2A,PRDM4,ARHGEF3 9,AKAP13,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,IKBKB,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,KIT,K RAS,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MEF2A,MEF2C,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K1 1,NCAM1,NEFL,NF1,NGF,NRAS,NTRK2,OMG,FURIN,PAQR3,PDE1B,PDGFB,PDGF RA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2 R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKC A,PRKCD,PRKCE,PRKCI,MAPK1,MAPK3,MAPK7,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA 2,PSMD7,PSMD12,PTEN,RAC1,RAF1,RALB,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PI P4K2C,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,ITSN1,SH3GL2,CNKSR2,ARHGEF15,PHLPP2,

					SOS1,SOS2,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,FGD4,ARHGEF9,PHLPP1,ADAM17,MCF2L,ARHGEF12,ARHGEF18,PIP5K1C,TIAM1,DUSP16,TP53,TRIO,VAV2,VCL,RICTOR,YWHAB,RTN4,RASGEF1A
Pathways in cancer	4,127E-18	132E-14	174	395	ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,AXIN2,FZD4,FZD6,FZD8,AKT2,CUL2,PIK3R3,APC,XIAP,FAS,FASLG,RHOA,ARNT,CCND1,BCL2,BCL2L1,BCR,BMP2,BMP4,CASP3,CASP8,RUNX1,RUNX1T1,CBL,CCNE1,CCNE2,CDC42,CDK2,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,CEBPA,CHUK,COL4A1,ROCK2,COL4A2,COL4A3,COL4A5,COL4A6,CRK,CRKL,APPL1,CTBP2,CTNNA2,CTNNB1,TCF7L1,DAPK1,DCC,ARHGEF11,RASSF5,AKT3,DVL1,DVL3,E2F1,E2F2,E2F3,LPAR1,EDNRA,EDNRB,RASGRP1,GNB4,LEF1,EP300,EPAS1,ETS1,MECOM,F2R,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGF11,FGF13,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FLT3,FN1,GNB5,GLI3,GNA12,GNAI1,GNAI3,GNAQ,GNB1,GNG5,LPAR4,GRB2,FZD10,HGF,HIF1A,IGF1,IGF1R,IKBKB,CXCL8,ITGA6,ITGA2,ITGAV,JAK1,JUN,KIT,KRAS,LAMA3,LAMC1,LAMC2,SMAD2,SMAD3,SMAD4,MAX,MET,KITLG,MITF,MMP2,NRAS,CYCS,PDGFB,PDGFRA,WNT4,PIK3CA,PIK3R1,PLCB4,PLCG1,PLD1,EGLN1,PRKACB,PRKCA,MAPK1,MAPK3,MAPK9,MAP2K1,PTCH1,PTEN,PTGER2,PTGER3,PTGER4,RAC1,RAF1,RALB,EGLN3,EGLN2,RARB,RB1,RET,ROCK1,CXCL12,SLC2A1,SOS1,SOS2,STAT3,STK4,PLCB1,ELOC,TCF7,TCF7L2,ARHGEF12,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,HHIP,TP53,TPM3,TRAF3,VEGFA,WNT1,WNT3,WNT7A,WNT3A,FZD3,CCDC6,NCOA4
NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	3,547E-17	1,14E-13	170	390	ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,BRAP,ADORA2A,AP2A1,AP2B1,PIP5K1B,AKT2,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,RHOA,SPTBN4,LAMTOR3,ATF1,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,CALM1,CALM3,CAMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B,RPS6KA5,MAPKAPK2,CHUK,AP2M1,CLTC,RASAL2,CREB1,CRK,CRKL,MAPK14,RAPGEF2,DLG4,DNM2,AKT3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,RAPGEF1,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,KIT,KRAS,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MEF2A,MEF2C,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NGF,NRAS,NTRK2,PAQR3,PDE1B,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCA,PRKCD,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAPK7,MAP2K1

					,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PTEN,RAF1,RALB,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,SH3GL2,CNKSR2,PHLPP2,SOS1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PHLPP1,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VCL,RICTOR,YWHAB,RASGEF1A
Signaling by EGFR	4,852E-17	156E-13	162	367	ADAM10,ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,BRAP,PIP5K1B,AKT2,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,SPTBN4,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,ARHGEF7,CALM1,CALM3,CAMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CBL,CD28,CD80,CD86,CDC42,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,RASAL2,CREB1,LRIG1,RAPGEF2,DLG4,AKT3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,EP515,SPRY1,SPRY2,STAM2,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,KIT,KRAS,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NRAS,PAQR3,PDE1B,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,SH3KBP1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCA,PRKCD,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PTEN,PTPN3,PTPN12,PTPRK,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,SH3GL2,CNKSR2,PHLPP2,SOS1,PAG1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,PHLPP1,ADAM17,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VCL,RICTOR,YWHAB,RASGEF1A,ADAM12
Fc epsilon receptor (FCER1) signaling	3,97E-14	1,27E-10	159	381	BRAP,PIP5K1B,AKT2,CUL3,CUL1,PIK3R3,TNRC6C,SPTBN4,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,BTRC,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CD28,CD80,CD86,CDC34,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,RASAL2,CREB1,RAPGEF2,DLG4,AKT3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,VA V3,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,TAB3,IKBKB,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,JUN,KIT,KRAS,LYN,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MAP3K11,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NFATC3,NRAS,PAK1,PAK2,PAQR3,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PPP3CA,PPP3CB,PPP3R1,MAPK1,MAPK3,MAPK9,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PTEN,RAC1,RAF1,RAP1A

,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,MAP2K4,CNKSR2,PHLPP2,SOS1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,TAB2,PHLPP1,MAP3K7,FBXW11,PIP5K1C,DUSP16,TP53,TXK,UBE2D1,UBE2D2,UBE2N,UBE2V1,VAV2,VCL,RICTOR,YWHAB,RASGEF1A

Signalingby PDGF	2,32E-14	7,40E-11	159	379	ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,BRAP,PIP5K1B,AKT2,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,SPTBN4,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,CALM1,COL6A6,CALM3,CAMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,RASAL2,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A5,CREB1,CRK,CRKL,RAPGEF2,DLG4,AKT3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,GRB7,RAPGEF1,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,KIT,KRAS,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NRAS,FURIN,PAQR3,PDE1B,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCA,PRKCD,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PTEN,PTPN12,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,CNKSR2,PDGFD,PHLPP2,SOS1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PHLPP1,PIP5K1C,THBS1,DUSP16,TP53,VCL,RICTOR,YWHAB,RASGEF1A
------------------	----------	----------	-----	-----	---

Downstream signal transduction	6,35E-14	2,04E-10	150	355	ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,BRAP,PIP5K1B,AKT2,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,SPTBN4,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,CALM1,CALM3,CAMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,RASAL2,CREB1,CRK,CRKL,RAPGEF2,DLG4,AKT3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,GRB7,RAPGEF1,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,KIT,KRAS,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NRAS,PAQR3,PDE1B,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCA,PRKCD,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PT
--------------------------------	----------	----------	-----	-----	--

					EN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,CNKSR2,PHLPP2,SOS1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PHLPP1,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VCL,RICTOR,YWHAB,RASGEF1A
DAP12 signaling	9,82E-13	3,15E-09	148	359	ADCY1,ADCY2,ADCY3,ADCY9,BRAP,PIP5K1B,AKT2,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,SPTBN4,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,CALM1,CALM3,CAMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,RASAL2,CREB1,RAPGEF2,DLG4,AKT3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,VAV3,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AHCYL1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,KIT,KRAS,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NRAS,PAQR3,PDE1B,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PLCG1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCA,PRKCD,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PTEN,RAC1,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,CNKSR2,PHLPP2,SOS1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,PHLPP1,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VAV2,VCL,RICTOR,YWHAB,RASGEF1A
Signaling by SCF-KIT	8,83E-13	2,83E-09	142	340	BRAP,PIP5K1B,AKT2,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,SPTBN4,LAMTOR3,SOCS1,IRS2,PEA15,IQGAP1,KSR1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CBL,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B,CHEK1,SOCS6,CHUK,RASAL2,CREB1,RAPGEF2,DLG4,AKT3,SH2B3,HBEGF,DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP7,DUSP8,DUSP9,RANBP9,PTPRU,RASGRP1,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,FN1,GAB1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,GRB7,GRB10,GRIN1,GRIN2A,DUSP10,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,ITGB3,JAK1,KIT,KRAS,LYN,PIK3AP1,SPRED2,MARK3,MET,AGO4,KITLG,AGO3,MAP3K11,NCAM1,NEFL,NF1,NRAS,PAQR3,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,ICOS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKCA,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,IL17RD,DAB2IP,PSMA2,PSMD7,PSMD12,PTEN,RAC1,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,CNKSR2,PHLPP2,SOS1,SPTBN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PHLPP1,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VCL,RICTOR,YES1,YWHAB,RASGEF1A

Proteoglycans cancer	in	3,86E-15	1,24E-11	101	203	FZD4,FZD6,FZD8,AKT2,ANK2,ANK3,PIK3R3,FAS,FASLG,RHOA,CCND1,IQGAP1,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CASP3,CBL,CDC42,CDKN1A,ROCK2,MAPK14,CTNNB1,DDX5,AKT3,HBEGF,EIF4B,ERBB3,ERBB4,ESR1,FGF2,FGFR1,FLNB,FLNC,FN1,GAB1,FRS2,PDCD4,GRB2,FZD10,HGF,HIF1A,HPSE2,HSPG2,IGF1,IGF1R,IHH,ITGA2,ITGA5,ITGAV,ITGB3,ITPR1,KDR,KRAS,SMAD2,MET,MMP2,MSN,PPP1R12A,PPP1R12B,NRAS,PAK1,PDPK1,WNT4,PIK3CA,PIK3R1,PLAU,PLCG1,PPP1CB,PRKACB,PRKCA,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,PPP1R12C,PTCH1,RAC1,RAF1,RDX,ROCK1,RPS6KB1,SDC1,SDC2,RRAS2,MRAS,SLC9A1,SOS1,SOS2,STAT3,ARHGEF12,TFAP4,TGFB2,THBS1,TIAM1,TP53,VAV2,VEGFA,WNT1,WNT3,WNT7A,WNT3A,FZD3
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells		8,34E-13	2,67E-09	73	139	ACVR1,ACVR1B,ACVR2A,ACVR2B,AXIN2,FZD4,FZD6,FZD8,AKT2,PIK3R3,APC,ZFHX3,BMI1,BMP4,BMPR1A,BMPR2,KLF4,HAND1,MAPK14,CTNNB1,AKT3,DUSP9,DVL1,DVL3,PCGF3,FGF2,FGFR1,FGFR2,PCGF5,GRB2,FZD10,ID2,ID4,IGF1,IGF1R,IL6ST,INHBB,ISL1,JAK1,JARID2,KRAS,LIF,SMAD1,SMAD2,SMAD3,SMAD4,SMAD5,MEIS1,NEUROG1,NRAS,OTX1,PAX6,WNT4,PIK3CA,PIK3R1,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,RAF1,REST,SKIL,SOX2,STAT3,TBX3,TCF3,WNT1,WNT3,WNT7A,ACVR1C,ZIC3,SMARCAD1,WNT3A,FZD3
FoxO signaling pathway		1,33E-12	4,27E-09	70	139	AKT2,FBXO32,PIK3R3,FASLG,IRS2,CCND1,BCL6,CAT,CCND2,CCNG2,CDK2,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,HOMER1,MAPK14,AKT3,BCL2L11,S1PR1,EP300,KLF2,FOXG1,FOXO1,FOXO3,G6PC3,G6PC,NLK,PLK2,GRB2,GRM1,IGF1,IGF1R,IKBKB,IL10,INSR,IRS1,KRAS,SMAD2,SMAD3,SMAD4,NRAS,PDPK1,PIK3CA,PIK3R1,PRKAA1,PRKAA2,PRKAB2,MAPK1,MAPK3,MAPK9,MAP2K1,PTEN,RAF1,RAG1,RBL2,SGK1,SLC2A4,SOD2,SOS1,SOS2,STAT3,STK4,STK11,SIRT1,TGFB2,TGFB1,TGFBR2,SETD7,SGK3,GABARAPL1
PI3K/AKT activation		2,49E-12	7,99E-09	68	128	PIP5K1B,AKT2,PIK3R3,TNRC6C,RHOA,IRS2,CD28,CD80,CD86,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,CREB1,AKT3,HBEGF,AGO1,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FGFR2,FOXO1,FOXO3,GAB1,AGO2,FRS2,TNRC6A,GRB2,HGF,NRG1,NR4A1,INSR,IRS1,KIT,PIK3AP1,MET,AGO4,KITLG,AGO3,NGF,PDGFB,PDGFRA,PDPK1,IP1,COS,PIK3CA,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP2

					R5C,PPP2R5E,MAPK1,MAPK3,PTEN,PIP4K2C,PHLPP2,TNRC6B,PHLPP1,PIP5K1C,TP53,RICTOR
Neurotrophin signaling pathway	1,42E-12	4,56E-09	65	119	AKT2,PIK3R3,FASLG,RHOA,ARHGDI1,RIPK2,BCL2,BDNF,CALM1,CALM3,CAMK4,CAMK2A,CAMK2D,CAMK2G,CDC42,RPS6KA5,MAPKAPK2,CRK,CRKL,MAPK14,AKT3,SH2B3,IRAK4,FOXO3,GAB1,FRS2,RPS6KA6,GRB2,RAPGEF1,PRDM4,IKBKB,IRAK2,IRS1,JUN,KRAS,MAP3K1,MAP3K3,MAP3K5,NGF,NRAS,NTF3,NTRK2,NTRK3,PDPK1,PIK3CA,PIK3R1,PLCG1,PRKCD,MAPK1,MAPK3,MAPK7,MAPK9,MAP2K1,PSEN1,RAC1,RAF1,RAP1A,RAP1B,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,SORT1,SOS1,SOS2,TP53
ErbB1 down stream signaling	2,76E-14	8,83E-11	61	102	ARF4,ATF1,IQGAP1,KSR1,WASL,RPS6KA4,CALM1,CALM3,SH2D2A,CDC42,RPS6KA5,CHN2,CREB1,ATF2,USP6NL,ABI1,DUSP1,DUSP6,ARPC5,ACTR3,ACTR2,EGR1,EPAS1,BAIAP2,GAB1,MAP3K2,NCKAP1,YWHAQ,GRB2,JUN,SMAD1,MEF2C,MAP3K1,PDPK1,PIK3CA,PIK3R1,PLD1,PPP2CA,PPP2R1A,PPP2R2A,PRKCA,PRKCD,MAPK1,MAPK3,MAPK7,MAPK9,MAP2K1,RAC1,RAF1,RPS6KA3,MAP2K4,SLC9A1,SOS1,SRF,STAT3,VAV2,RICTOR,YWHAB,YWHAG,YWHAH,YWHAZ
Renal cell carcinoma	2,08E-13	6,66E-10	44	102	AKT2,CUL2,PIK3R3,ARNT,CDC42,CRK,CRKL,AKT3,EP300,EPAS1,ETS1,GAB1,GRB2,RAPGEF1,HGF,HIF1A,JUN,KRAS,MET,NRAS,PAK1,PAK2,PAK3,PDGFB,PIK3CA,PIK3R1,EGLN1,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,RAC1,RAF1,EGLN3,EGLN2,RAP1A,RAP1B,SLC2A1,SOS1,SOS2,ELOC,TGFB2,VEGFA,PAK6,PAK5

**Anexo 7.** Principais vias de sinalização significativas na DC em pacientes não respondedores vs controle.

Via molecular	p	q ajustado Bonferroni	n° genes	n°total genes na via	genes-alvo participantes da via
Axon guidance	4,65E-14	1,24E-10	119	554	ABL2,MET,KITLG,AP2B1,SRGAP1,SEMA6A,ALCAM,MMP2,CUL3,ANK2,ANK3,PIK3R3,CNTNAP1,SHTN1,ARRB2,IRS2,PEA15,MYH9,MYL6,NRP2,NF1,CACNA1D,CACNB1,CACNB3,RPS6KA4,KALRN,CALM3,CAMK2G,SEMA5A,CDC42,PDGFB,PDGFRA,RPS6KA5,PDGFRB,PFN2,PIK3R1,CLTC,PLCG1,PLXNA1,COL4A1,ROCK2,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL6A3,COL9A1,CREB1,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP5C,CSK,PRKACB,DNM3,MAPK1,RAPGEF2,MAP2K1,PRNP,ARHGEF11,DCX,RAC1,DPYSL2,HBEGF,DUSP2,DUSP8,RET,NTN4,EFNA5,EFNB1,AKAP9,APH1A,ROBO1,SPRED1,ROBO2,ROCK1,EPHA4,EPHA5,ERBB3,ERBB4,EREG,RPS6KA2,RPS6KA3,RRAS,SCN1A,SCN2A,SCN2B,FGF9,ITSN1,DPYSL4,ENAH,GAB1,SCN3B,SOS1,SPTAN1,SPTBN1,FRS2,GFRA1,PSME4,CNTN2,GRB10,SRGAP2,GRIN2A,ARHGAP35,TIAM1,HSPA8,VCL,VEGFA,YES1,SHANK3,ITGB1,JAK1,ST8SIA4,KRAS,RASGEF1A,LAMC1,FGF23,LIMK1,ST8SIA2
Signalling by NGF	5,29E-08	1,41E-04	91	483	PIK3AP1,ABR,ADCY6,MET,AGO4,KITLG,AP2B1,PIP5K1A,CUL3,PIK3R3,ARRB2,IRS2,PEA15,NF1,KALRN,CALM3,CAMK2G,NTRK2,CASP2,FURIN,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,RPS6KA5,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,CLTC,PLCG1,CREB1,CRK,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R5A,MAPK14,PPP5C,CSK,PRKACB,DNM3,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCI,MAPK1,RAPGEF2,MAP2K1,PTEN,ARHGEF11,TIAM2,RAC1,RALGDS,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP8,RET,RIT1,AGO1,AKAP9,APH1A,SPRED1,PIP4K2C,ERBB3,ERBB4,EREG,RPS6KA2,RPS6KA3,FGF9,FOXO3,ITSN1,GAB1,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN1,FRS2,TNRC6B,GFRA1,STAT3,PSME4,TNRC6A,GRIN2A,TIAM1,AKAP13,VCL,RICTOR,YWHAE,ITPR1,JAK1,KRAS,RASGEF1A,FGF23
Pathways in cancer	2,70E-09	7,22E-06	82	395	ADCY6,FZD4,FZD6,MET,KITLG,MMP2,PIK3R3,BIRC2,ARNT,CCND1,BCL2,CCNE2,CYCS,CDC42,CDK2,CDK6,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,

					GNG2,PIK3R1,PLCB4,PLCG1,COL4A1,ROCK2,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,CRK,TRAF4,CSF1R,PRKACB,PRKCB,MAPK1,MAP2K1,PTEN,ARHGEF11,RAC1,RALGDS,AKT3,RARB,RB1,E2F1,E2F2,E2F3,RET,EDNRB,ROCK1,GNB4,LEF1,EPAS1,ETS1,FGF9,CXCL12,FOS,SOS1,STAT3,GNG12,PLCB1,GNAI2,TGFBR2,HHIP,HIF1A,TRAF5,VEGFA,WNT5A,IGF1,ITGA6,ITGB1,JAK1,FZD5,KRAS,LPAR5,FZD3,LAMA2,LAMC1,FGF23,SMAD2,SMAD4
Signaling by PDGF	4,38E-09	1,17E-05	79	379	PIK3AP1,ADCY6,MET,AGO4,KITLG,PIP5K1A,CUL3,PIK3R3,ARRB2,IRS2,PEA15,NF1,CALM3,CAMK2G,FURIN,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PLCG1,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL6A3,COL9A1,CREB1,CRK,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R5A,PPP5C,CSK,PRKACB,PRKAR2A,PRKAR2B,MAPK1,RAPGEF2,MAP2K1,PTEN,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP8,RET,AGO1,AKAP9,SPRED1,PIP4K2C,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF9,FOXO3,PDGFD,GAB1,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN1,FRS2,TNRC6B,GFRA1,STAT3,PSME4,TNRC6A,PDGFC,GRIN2A,THBS2,VCL,RICTOR,ITPR1,JAK1,KRAS,RASGEF1A,FGF23
PI3K-Akt signaling pathway	6,53E-11	1,74E-07	78	342	PIK3AP1,MCL1,MET,KITLG,PIK3R3,MYB,CCND1,BCL2,CREB3L1,CCND2,CCNE2,CDK2,CDK6,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,GNG2,PIK3R1,COL1A1,COL1A2,EIF4E2,COL2A1,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,COL6A3,COL9A1,CREB1,CREB5,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R3A,PPP2R5A,CSF1R,PRKAA1,PKN2,MAPK1,MAP2K1,RELN,PTEN,RAC1,AKT3,RHEB,EFNA5,GNB4,FGF9,FOXO3,SGK1,PDGFD,G6PC,PHLPP2,SOS1,GNG12,PDGFC,THBS2,TSC1,SGK3,VEGFA,YWHAH,YWHAG,YWHAH,IFNAR2,IGF1,IL6R,ITGA6,ITGB1,ITGB4,ITGB8,JAK1,KRAS,LPAR5,LAMA2,LAMC1,FGF23
NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	3,67E-08	9,80E-05	78	390	PIK3AP1,ADCY6,MET,AGO4,KITLG,AP2B1,PIP5K1A,CUL3,PIK3R3,ARRB2,IRS2,PEA15,NF1,CALM3,CAMK2G,NTRK2,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,RPS6KA5,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,CLTC,PLCG1,CREB1,CRK,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R5A,MAPK14,PPP5C,CSK,PRKACB,DNM3,PRKAR2A,PRKAR2B,

					MAPK1,RAPGEF2,MAP2K1,PTEN,RALGDS,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP8,RET,RIT1,AGO1,AKAP9,SPRED1,PIP4K2C,ERBB3,ERBB4,EREG,RPS6KA2,RPS6KA3,FGF9,FOXO3,GAB1,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN1,FRS2,TNRC6B,GFRA1,STAT3,PSME4,TNRC6A,GRIN2A,VCL,RICTOR,ITPR1,JAK1,KRAS,RASGEF1A,FGF23
Extra cellular matrix organization	1,70E-08	4,55E-05	65	298	MFAP2,MFAP3,MMP2,MMP16,NID1,CAPN6,SERPINH1,FURIN,SERPINE1,CD47,PDGFB,COL22A1,PLOD1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL3A1,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,COL5A1,COL5A2,COL6A3,COL7A1,COL9A1,COL11A1,COL12A1,COL15A1,COL19A1,ADAMTS1,COL5A3,COL23A1,CTSK,DAG1,COL24A1,F11R,NTN4,ELN,FBN1,EFEMP1,LOXL4,NID2,SPARC,P3H1,ADAMTS18,LOXL3,ADAMTS5,TIMP2,CAPN7,TLL1,TLL2,ITGA6,ITGB1,ITGB4,ITGB8,ADAMTS9,COL21A1,LAMA2,LAMC1,LOX,LOXL2,LRP4
Rap1 signaling pathway	1,55E-08	4,13E-05	51	210	ADCY6,MET,KITLG,PIK3R3,CALM3,P2RY1,CDC42,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,PFN2,PIK3R1,PLCB4,PLCG1,CNR1,CRK,MAPK14,CSF1R,PRKCB,PRKCI,PRKD1,MAPK1,CTNND1,RAPGEF2,MAP2K1,DOCK4,MAGI2,RAC1,RALGDS,AKT3,EFNA5,RRAS,FGF9,MRAS,MAGI3,SIPA1,PDGFD,PARD6B,PLCB1,GNAI2,PDGFC,RAPGEF4,GRIN2A,TIAM1,VEGFA,ID1,IGF1,ITGB1,KRAS,LPAR5,FGF23
Focal adhesion	6,41E-09	1,71E-05	50	199	MET,PIK3R3,BIRC2,MYLK,CCND1,BCL2,CAV2,CCND2,CDC42,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,PIK3R1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL4A1,ROCK2,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,COL6A3,COL9A1,CRK,PPP1CB,PPP1CC,PRKCB,MAPK1,MAP2K1,RELN,PTEN,RAC1,AKT3,ROCK1,PDGFD,SOS1,PDGFC,ARHGAP35,THBS2,VCL,VEGFA,IGF1,ITGA6,ITGB1,ITGB4,ITGB8,LAMA2,LAMC1
Proteoglycans in cancer	3,64E-08	9,72E-05	49	203	FZD4,FZD6,MET,MMP2,ANK2,ANK3,PIK3R3,CCND1,CAMK2G,CAV2,CD42,PIK3R1,PLCG1,ROCK2,PPP1CB,PPP1CC,MAPK14,PRKACB,PRKCB,M

					APK1,MAP2K1,DDX5,RAC1,AKT3,HBEGF,ROCK1,ERBB3,ERBB4,ESR1,RRAS,MRAS,GAB1,SOS1,FRS2,PDCD4,STAT3,TIAM1,TIMP3,HIF1A,VEGFA,WNT5A,IGF1,ITGB1,ITPR1,COL21A1,FZD5,KRAS,FZD3,SMAD2
Integrin signaling pathway	9,56E-11	2,56E-07	48	167	MAP3K3,MAP3K5,PIK3R3,RND3,ARL1,RAP2C,CDC42,PIK3R1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL3A1,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,COL5A1,COL5A2,COL6A3,COL7A1,COL9A1,COL11A1,COL12A1,COL15A1,COL19A1,COL5A3,CRK,CSK,MAPK6,MAP2K1,ELMO1,RAC1,NTN4,RRAS,MAP2K4,ELMO2,MAP3K2,SOS1,ARHGAP26,VCL,ITGA6,ITGB1,ITGB4,ITGB8,LAMA2,LAMC1
GAB1 signalosome	3,91E-08	1,05E-04	36	128	PIK3AP1,MET,AGO4,KITLG,PIP5K1A,PIK3R3,IRS2,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,CREB1,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R5A,CSK,MAPK1,PTEN,AKT3,HBEGF,AGO1,PIP4K2C,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF9,FOXO3,GAB1,PHLPP2,FRS2,TNRC6B,TNRC6A,RICTOR,FGF23
Collagen formation	8,27E-12	2,21E-08	35	93	SERPINH1,COL22A1,PLOD1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL3A1,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,COL5A1,COL5A2,COL6A3,COL7A1,COL9A1,COL11A1,COL12A1,COL15A1,COL19A1,COL5A3,COL23A1,COL24A1,LOXL4,P3H1,LOXL3,TLL1,TLL2,ITGA6,ITGB4,COL21A1,LOX,LOXL2
PIP3 activates AKT signaling	6,81E-08	1,82E-04	35	125	PIK3AP1,MET,AGO4,KITLG,PIP5K1A,PIK3R3,IRS2,CDKN1B,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,CREB1,PPP2CA,PPP2R1B,PPP2R5A,MAPK1,PTEN,AKT3,HBEGF,AGO1,PIP4K2C,ERBB3,ERBB4,EREG,FGF9,FOXO3,GAB1,PHLPP2,FRS2,TNRC6B,TNRC6A,RICTOR,FGF23
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	1,31E-09	3,51E-06	33	99	MMP2,PIK3R3,CCND1,BCL2,SERPINE1,CDC42,CDKN1B,PIK3R1,PLCB4,PLCG1,COL1A1,COL1A2,COL3A1,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL4A6,MAPK14,PRKCB,MAPK1,RAC1,AKT3,F3,STAT3,PLCB1,TGF

BR2, VEGFA, IL1A, KRAS, SMAD2, SMAD4					
Choline metabolism in cancer	8,56E-08	2,29E-04	30	99	PIP5K1A, PIK3R3, DGKZ, DGKD, WASF1, DGKI, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, DGKH, PIK3R1, PLCG1, PCYT1B, PRKCB, MAPK1, MAP2K1, RAC1, RALGDS, AKT3, RHEB, FOS, PDGFD, SOS1, SP1, PDGFC, GPCPD1, HIF1A, TSC1, KRAS, SLC44A2
Small cell lung cancer	5,25E-09	1,40E-05	29	84	PIK3R3, BIRC2, CCND1, BCL2, CCNE2, CYCS, CDK2, CDK6, CDKN1B, PIK3R1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, TRAF4, PTEN, AKT3, RARB, RB1, E2F1, E2F2, E2F3, TRAF5, ITGA6, ITGB1, LAMA2, LAMC1
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	4,91E-09	1,31E-05	28	79	MET, PIK3R3, AXL, BCL2, NF1, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PIK3R1, PLCG1, EIF4E2, PRKCB, MAPK1, MAP2K1, PTEN, AKT3, ERBB3, FOXO3, PDGFD, GAB1, SOS1, STAT3, PDGFC, VEGFA, IGF1, IL6R, JAK1, KRAS
Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	1,49E-11	3,99E-08	27	60	COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL6A3, COL7A1, COL9A1, COL11A1, COL15A1, COL5A3, COL24A1, LOXL4, LOXL3, TLL1, TLL2, ITGA6, ITGB4, LOXL2

**Anexo 8.** Principais vias de sinalização significativas na RCU em pacientes respondedores vs controle.

Via molecular	p	q ajustado Bonferroni	n° genes	n° total genes na via	genes-alvo participantes da via
Adaptive Immune System	4,68E-07	1,40E-03	194	826	AP2A1,AP2B1,AP1G1,CUL3,CUL2,SH3RF1,PIK3R3,TNRC6C,ARF1,TRIB3,IRS2,VAMP8,CDC23,BLMH,HERC3,HERC2,BTRC,CALM1,CALM3,CANX,MAP3K14,CBL,CD28,CDC27,CDC42,CDKN1A,CDKN1B,UBE4A,KIF3B,ASB7,HECTD1,KIF23,RNF19A,MAP3K8,NPEPPS,CREB1,SEC24C,CSK,DYNLL2,DNM3,UBE3C,CTSS,RNF144B,WSB1,KIF26A,FBXL3,FBXL5,KLHL3,AREL1,DYNC1I1,DYNC1LI2,DNM2,AKT3,ITCH,HBEGF,ZNRF2,ACTR1A,AGO1,SAR1B,RLIM,RNF41,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,MEX3C,ARIH2,IFI30,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,SPSB4,FGFR1,UBE2E3,RNF138,FOXO1,FOXO3,UBE2J1,ATG7,GAB1,AHCYL1,DCTN5,SEC24A,KBTBD8,FRS2,KLHL20,TNRC6A,TRIM63,UBE2Q2,WWP1,RAPGEF4,ORAI1,KLHL2,NRG1,UBE2K,IKBKB,INSR,IRS1,ITGA4,ITGAV,ITGB1,ITPR1,KIF2A,KIF5A,KIF5B,KLC1,LMO7,HECTD2,AGO4,BTLA,MYLIP,RACGAP1,TRIM37,NEDD4,PAK3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,SEC61A1,CTSA,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKG1,MAPK1,MAPK3,RNF111,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,PTPRJ,RAF1,RAP1A,RAP1B,HECTD3,RBBP6,RNF4,RNF6,FBXO31,PIP4K2C,UBE2W,FBXW7,TRIM36,UBE2Q1,SH3GL2,SIAH1,ENAH,FBXO21,PHLPP2,PDCD1LG2,SOS1,RNF130,PAG1,SPTBN2,TNRC6B,TAB2,RNF217,STIM1,PSME4,FBXW11,NEDD4L,PIP5K1C,TP53,TRPC1,MKRN1,UBE2B,UBE2D1,UBE2E2,UBE2G1,UBE2V1,UNKL,SMURF2,VASP,KLC2,RICTOR,YES1,YWHAZ,TRIM9,UBE2Z,SMURF1,KLC4,GAN
Disease	1,36E-05	4,08E-02	194	867	SEH1L,AMER1,ADAM10,FZD4,AP2A1,AP2B1,AP1G1,ACAN,MIB1,PIK3R3,APC,APP,FASLG,ARF1,IRS2,BCR,IQGAP1,KAT2B,CDK5R1,BTRC,CALM1,CALM3,CANX,CAST,SEMA5A,CBL,CCNC,CCNT2,CD28,CDC25A,LRRFIP1,CDKN1A,CDKN1B,NAPEPLD,ZFYVE9,CLCN6,QKI,ADAMTS3,ADAMTS2,VPS4B,CREB1,NCOR2,CSK,CTNBN1,CTNND1,CUX1,HDAC4,DAG1,CHMP7,POM121,SV2B,AKT3,PDCD6IP,BCL2L11,HBEGF,DERL2,AKAP9,IRAK4,PSME3,VPS28,PSMD14,EP300,EP315,ERBB3,EREG,CD320,GPC4,FG

F2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FKBP1A,FOXO1,FOXO3,ATG7,CSPG5,GAB1,NUP50,VPS4A,FRS2,ADAMTSL1,ADAMTS5,GTF2H1,ERLIN2,ADAMTS7,ADAMTS6,GYS1,SUPT16H,NRG1,HMGA1,HES1,HSPG2,IDH1,IHH,IKBKB,IRS1,ITGB3,JUN,KPNA1,KPNA2,KPNA3,KPNA4,IPO5,DLL1,LRP6,SMAD2,SMAD3,MARK3,MAP3K11,NF1,NOTCH1,NOTCH2,NPM1,NUP43,FURIN,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,SEMA5B,PIK3R1,TAF7L,DLL4,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,MAP2K3,MAP2K6,DAB2IP,PSMA2,ESRP1,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,RNF43,RAF1,VPS37C,RAP1A,RAP1B,RASA1,TBL1XR1,RPL15,FBXW7,CBLL1,RPL28,SDC2,MAP2K4,SH3GL2,MYO18A,NUP35,SNAP25,TNKS2,SOS1,STAT3,PSME4,NUP210,VAMP1,ADAMTS17,ADAMTS18,SYT1,TAF4,TAF5,TAF11,NUP160,TBL1X,TBP,NEDD4L,TGFBR2,MACF1,KDM7A,TRAF3,TSG101,VCP,RICTOR,XPO1,YWHAE,ZMYM2,ADAMTS9,FZD5,WNT3A,ADAMTSL3,ADAMTS10,FXR1,PABPN1,ELL

Vesicle-mediated transport	8,89E-11	2,67E-07	176	660	SYS1,FZD4,ADRB2,AP2A1,AP2B1,AP1G1,ULK1,RIC1,AMPH,ANK2,ANK3,CNIH2,APP,ARCN1,ARF1,ARF5,ARL1,VAMP8,STX16,GBF1,RAB11A,SYNJ1,WASL,CALM1,CALM3,HIP1R,FCHO2,CBL,RABEP1,REPS2,COPS2,CHR2M2,TRIP11,TRIP10,RAB9A,KIF3B,COL1A1,COL1A2,COL3A1,COL4A1,COL4A2,COL7A1,KIF23,VPS4B,GOSR1,CPD,NECAP1,TBC1D10B,SEC24C,GCC2,DYNLL2,DNM3,CUX1,LDLRAP1,GAPVD1,KIF26A,DAB2,COG3,COPS7A,CHMP7,SNAP91,DENND4B,DYNC111,DYNC1L12,DNM2,AKT3,ACTR2,ARPC2,SAR1B,CNIH1,VPS28,STX6,RAB9B,EP15,SNX9,VPS54,VPS25,RAB14,TGOLN2,ARFGAP2,EXOC5,KIF1C,GALNT1,DCTN5,VPS4A,RAB8B,SEC24A,GJA1,RAB10,RAB30,YWHAQ,GNS,GOLGA1,GOLGA4,GRIA1,SCOC,AGFG1,HSPA8,IGF2R,KIF2A,KIF5A,KIF5B,KLC1,VTI1A,LDLR,LRP2,M6PR,MAN2A1,RACGAP1,MYO5A,RAB12,DENND5B,NSF,OCRL,DENND6A,SH3D19,PAFAH1B1,PAFAH1B2,UBQLN1,PPP6C,PRKAB2,MASP1,FNBP1L,TBC1D8B,TBC1D20,RAB1A,STX17,RAB31L1,RAB5B,RAB5C,VPS37C,RALA,KIF26B,PPP6R3,SORT1,MIA3,KIF21A,SH3GL2,AAK1,TRAPPC8,SLC2A4,NAPB,RAB21,SNX2,KIF21B,SPARC,SPTAN1,KIF1B,SPTBN2,GGA3,STX5,STXBP3,VAMP7,SYT1,ANKRD28,DENND5A,BICD2,PIP5K1C,TRAPPC10,TMF1,HSP90B1,TSC1,TSG101,RABGAP1,COPS7B,TBC1D15,KLC2,YWHAE,YWHAG,YWHAH,YWHAZ,AGPAT3,LMAN2L,DENND1B,KLC4,NAA30
Membrane Trafficking	2,73E-11	8,19E-08	168	614	SYS1,FZD4,ADRB2,AP2A1,AP2B1,AP1G1,ULK1,RIC1,AMPH,ANK2,ANK3,CNIH2,APP,ARCN1,ARF1,ARF5,ARL1,VAMP8,STX16,GBF1,RAB11A,SYNJ1,WASL,CALM1,CALM3,HIP1R,FCHO2,CBL,RABEP1,REPS2,COPS2,CHR2M2,TRIP11,TRIP10,RAB9A,KIF3B,COL7A1,KIF23,VPS4B,GOSR1,CPD,NECAP1,TBC1D10B,SEC24C,GCC2,DYNLL2,DNM3,CUX1,LDLRAP1,GAPVD1,KIF26A,DAB2,COG3,COPS7A,CHMP7,SNAP91,DENND4B,DYNC111,DYNC1L12,DNM2,AKT3,ACTR2,ARPC2,SAR1B,CNIH1,VPS28,STX6,RAB9B,EP15,SNX9,VPS54,VPS25,RAB14,TGOLN2,ARFGAP2,EXOC5,KIF1C,GALNT1,DCTN5,VPS4A,RAB8B,SEC24A,GJA1,RAB10,RAB30,YWHAQ,GNS,GOLGA1,GOLGA4,GRIA1,

					SCOC,AGFG1,HSPA8,IGF2R,KIF2A,KIF5A,KIF5B,KLC1,VTI1A,LDLR,LRP2,M6PR,MAN2A1,RACGAP1,MYO5A,RAB12,DENND5B,NSF,OCRL,DENN6A,SH3D19,PAFAH1B1,PAFAH1B2,UBQLN1,PPP6C,PRKAB2,FNBP1L,TBC1D8B,TBC1D20,RAB1A,STX17,RAB3IL1,RAB5B,RAB5C,VPS37C,RALA,KIF26B,PPP6R3,SORT1,MIA3,KIF21A,SH3GL2,AAK1,TRAPPC8,SLC2A4,NAPB,RAB21,SNX2,KIF21B,SPTAN1,KIF1B,SPTBN2,GGA3,STX5,STXBP3,VAMP7,SYT1,ANKRD28,DENND5A,BICD2,PIP5K1C,TRAPPC10,TMF1,TSC1,TSG101,RABGAP1,COPS7B,TBC1D15,KLC2,YWHAE,YWHAG,YWHAH,YWHAZ,AGPAT3,LMAN2L,DENND1B,KLC4,NAA30
Signalling by NGF	1,17E-15	3,51E-12	152	483	ADCY3,ADORA2A,AP2A1,AP2B1,PREX1,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,ARHGDI A,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,SQSTM1,CALM1,KALRN,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,RPS6KA5,MAPKAPK2,CREB1,CRK,CRKL,MAPK14,CSK,ARHGEF10,DNM3,ARHGEF3,RAPGEF2,ARHGEF11,ARHGEF17,DNM2,AKT3,BCL2L11,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,NET1,FGD1,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,PRDM4,AKAP13,DUSP10,NRG1,IKKB,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,MEF2A,AGO4,MAP3K11,N EFL,NF1,NTRK2,OMG,FURIN,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,I COS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAPK7,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RALA,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,SH3GL2,PHLPP2,SOS1,SOS2,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PSME4,FGD4,ARHGEF9,ARHGEF18,TEK,PIP5K1C,TIAM1,DUSP16,TP53,TRIO,VAV2,RICTOR,YWHAE,RTN4,RASGEF1A
Signaling by Interleukins	1,86E-07	5,58E-04	136	531	CUL3,PIK3R3,FASLG,LAMTOR3,IRS2,PEA15,CCND1,BCL2,BCL6,IQGAP1,SQSTM1,BTRC,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CBL,CDKN1A,CNTFR,COL1A2,MAP3K8,CRK,CRKL,CSF1,CSK,SOC5,RAPGEF2,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,S1PR1,AKAP9,IRAK4,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FO

					XO1,FOXO3,FLT3,FOS,FRS2,GRIN1,DUSP10,NRG1,HIF1A,HSPA8,TAB3,TXLNA,IKBKB,IL1A,IL1R1,IL1RAP,CXCL8,IL10RA,IRAK2,IRS1,ITGB1,ITGB3,JAK1,LIF,MARK3,MCL1,MAP3K3,MAP3K11,MMP2,NEFL,NF1,BRWD1,OSM,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,PIM1,PIK3R1,POU2F1,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,MAP2K6,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,RAF1,RAG1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,RORA,RORC,MAP2K4,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TAB2,STAT3,PSME4,FBXW11,ZEB1,TEK,DUSP16,TNFRSF1A,TP53,HSP90B1,UBE2V1,VEGFA,IL25,YES1,YWHAZ,PELI2,RASGEF1A
NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	1,74E-14	5,22E-11	127	390	ADCY3,ADORA2A,AP2A1,AP2B1,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,RPS6KA5,MAPKAPK2,CREB1,CRK,CRKL,MAPK14,CSK,DNM3,RAPGEF2,DNM2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,MEF2A,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,NTRK2,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,MAPK7,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RALA,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,SH3GL2,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PSME4,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,RICTOR,RASGEF1A
Cellular responses to stress	,84E-09	5,50E-06	127	454	SEH1L,ULK1,CUL2,CBX4,TNRC6C,ARNT,LAMTOR3,CDC23,ATG4A,EED,ATP7A,MTMR3,LIMD1,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CCNE1,CCNE2,CD27,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,CEBPB,MAPKAPK2,RRAGD,MAP4K4,ASF1A,ATG5,MINK1,BAG5,NOX4,HIGD1A,MAPK14,DYNLL2,WIPI2,ATG13,RB1CC1,CHMP7,POM121,DNAJB6,E2F1,E2F2,E2F3,PHC1,AGO1,PSME3,PSMD14,EP300,EPAS1,EPO,EZH2,CITED2,FKBP4,ATG7,FOS,RRAGA,NUP50,TNRC6A,GPX7,H1-0,H2AX,H2AZ1,H3-3B,AJUBA,HIF1A,HMGA1,HSPA8,ID1,IL1A,CXCL8,JUN,MDM4,MAP3K5,AGO4,NUP43,ATG9A,EGLN1,PRKAB2,MAPK1,MAPK3,MAPK7,MAPK9,

					MAP2K3,MAP2K6,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,ATG16L1,EGLN3,EGLN2,RB1,RBBP4,RBBP7,RNF2,RPA2,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,PHC3,MAP2K4,HSPA4L,ATG14,NUP35,SP1,TNRC6B,KDM6B,STAT3,PSME4,NUP210,NUP160,HIF3A,SIRT1,TFDP2,MTMR14,CBX6,SUZ12,TP53,TP53,UBI1,UBI2,UBI3,UBI4,UBI5,UBI6,UBI7,UBI8,UBI9,UBI10,UBI11,UBI12,UBI13,UBI14,UBI15,UBI16,UBI17,UBI18,UBI19,UBI20,UBI21,UBI22,UBI23,UBI24,UBI25,UBI26,UBI27,UBI28,UBI29,UBI30,UBI31,UBI32,UBI33,UBI34,UBI35,UBI36,UBI37,UBI38,UBI39,UBI40,UBI41,UBI42,UBI43,UBI44,UBI45,UBI46,UBI47,UBI48,UBI49,UBI50,UBI51,UBI52,UBI53,UBI54,UBI55,UBI56,UBI57,UBI58,UBI59,UBI60,UBI61,UBI62,UBI63,UBI64,UBI65,UBI66,UBI67,UBI68,UBI69,UBI70,UBI71,UBI72,UBI73,UBI74,UBI75,UBI76,UBI77,UBI78,UBI79,UBI80,UBI81,UBI82,UBI83,UBI84,UBI85,UBI86,UBI87,UBI88,UBI89,UBI90,UBI91,UBI92,UBI93,UBI94,UBI95,UBI96,UBI97,UBI98,UBI99,UBI100,UBI101,UBI102,UBI103,UBI104,UBI105,UBI106,UBI107,UBI108,UBI109,UBI110,UBI111,UBI112,UBI113,UBI114,UBI115,UBI116,UBI117,UBI118,UBI119,UBI120,UBI121,UBI122,UBI123,UBI124,UBI125,UBI126,UBI127,UBI128,UBI129,UBI130,UBI131,UBI132,UBI133,UBI134,UBI135,UBI136,UBI137,UBI138,UBI139,UBI140,UBI141,UBI142,UBI143,UBI144,UBI145,UBI146,UBI147,UBI148,UBI149,UBI150,UBI151,UBI152,UBI153,UBI154,UBI155,UBI156,UBI157,UBI158,UBI159,UBI160,UBI161,UBI162,UBI163,UBI164,UBI165,UBI166,UBI167,UBI168,UBI169,UBI170,UBI171,UBI172,UBI173,UBI174,UBI175,UBI176,UBI177,UBI178,UBI179,UBI180,UBI181,UBI182,UBI183,UBI184,UBI185,UBI186,UBI187,UBI188,UBI189,UBI190,UBI191,UBI192,UBI193,UBI194,UBI195,UBI196,UBI197,UBI198,UBI199,UBI200,UBI201,UBI202,UBI203,UBI204,UBI205,UBI206,UBI207,UBI208,UBI209,UBI210,UBI211,UBI212,UBI213,UBI214,UBI215,UBI216,UBI217,UBI218,UBI219,UBI220,UBI221,UBI222,UBI223,UBI224,UBI225,UBI226,UBI227,UBI228,UBI229,UBI230,UBI231,UBI232,UBI233,UBI234,UBI235,UBI236,UBI237,UBI238,UBI239,UBI240,UBI241,UBI242,UBI243,UBI244,UBI245,UBI246,UBI247,UBI248,UBI249,UBI250,UBI251,UBI252,UBI253,UBI254,UBI255,UBI256,UBI257,UBI258,UBI259,UBI260,UBI261,UBI262,UBI263,UBI264,UBI265,UBI266,UBI267,UBI268,UBI269,UBI270,UBI271,UBI272,UBI273,UBI274,UBI275,UBI276,UBI277,UBI278,UBI279,UBI280,UBI281,UBI282,UBI283,UBI284,UBI285,UBI286,UBI287,UBI288,UBI289,UBI290,UBI291,UBI292,UBI293,UBI294,UBI295,UBI296,UBI297,UBI298,UBI299,UBI300,UBI301,UBI302,UBI303,UBI304,UBI305,UBI306,UBI307,UBI308,UBI309,UBI310,UBI311,UBI312,UBI313,UBI314,UBI315,UBI316,UBI317,UBI318,UBI319,UBI320,UBI321,UBI322,UBI323,UBI324,UBI325,UBI326,UBI327,UBI328,UBI329,UBI330,UBI331,UBI332,UBI333,UBI334,UBI335,UBI336,UBI337,UBI338,UBI339,UBI340,UBI341,UBI342,UBI343,UBI344,UBI345,UBI346,UBI347,UBI348,UBI349,UBI350,UBI351,UBI352,UBI353,UBI354,UBI355,UBI356,UBI357,UBI358,UBI359,UBI360,UBI361,UBI362,UBI363,UBI364,UBI365,UBI366,UBI367,UBI368,UBI369,UBI370,UBI371,UBI372,UBI373,UBI374,UBI375,UBI376,UBI377,UBI378,UBI379,UBI380,UBI381,UBI382,UBI383,UBI384,UBI385,UBI386,UBI387,UBI388,UBI389,UBI390,UBI391,UBI392,UBI393,UBI394,UBI395,UBI396,UBI397,UBI398,UBI399,UBI400,UBI401,UBI402,UBI403,UBI404,UBI405,UBI406,UBI407,UBI408,UBI409,UBI410,UBI411,UBI412,UBI413,UBI414,UBI415,UBI416,UBI417,UBI418,UBI419,UBI420,UBI421,UBI422,UBI423,UBI424,UBI425,UBI426,UBI427,UBI428,UBI429,UBI430,UBI431,UBI432,UBI433,UBI434,UBI435,UBI436,UBI437,UBI438,UBI439,UBI440,UBI441,UBI442,UBI443,UBI444,UBI445,UBI446,UBI447,UBI448,UBI449,UBI450,UBI451,UBI452,UBI453,UBI454,UBI455,UBI456,UBI457,UBI458,UBI459,UBI460,UBI461,UBI462,UBI463,UBI464,UBI465,UBI466,UBI467,UBI468,UBI469,UBI470,UBI471,UBI472,UBI473,UBI474,UBI475,UBI476,UBI477,UBI478,UBI479,UBI480,UBI481,UBI482,UBI483,UBI484,UBI485,UBI486,UBI487,UBI488,UBI489,UBI490,UBI491,UBI492,UBI493,UBI494,UBI495,UBI496,UBI497,UBI498,UBI499,UBI500,UBI501,UBI502,UBI503,UBI504,UBI505,UBI506,UBI507,UBI508,UBI509,UBI510,UBI511,UBI512,UBI513,UBI514,UBI515,UBI516,UBI517,UBI518,UBI519,UBI520,UBI521,UBI522,UBI523,UBI524,UBI525,UBI526,UBI527,UBI528,UBI529,UBI530,UBI531,UBI532,UBI533,UBI534,UBI535,UBI536,UBI537,UBI538,UBI539,UBI540,UBI541,UBI542,UBI543,UBI544,UBI545,UBI546,UBI547,UBI548,UBI549,UBI550,UBI551,UBI552,UBI553,UBI554,UBI555,UBI556,UBI557,UBI558,UBI559,UBI560,UBI561,UBI562,UBI563,UBI564,UBI565,UBI566,UBI567,UBI568,UBI569,UBI570,UBI571,UBI572,UBI573,UBI574,UBI575,UBI576,UBI577,UBI578,UBI579,UBI580,UBI581,UBI582,UBI583,UBI584,UBI585,UBI586,UBI587,UBI588,UBI589,UBI590,UBI591,UBI592,UBI593,UBI594,UBI595,UBI596,UBI597,UBI598,UBI599,UBI600,UBI601,UBI602,UBI603,UBI604,UBI605,UBI606,UBI607,UBI608,UBI609,UBI610,UBI611,UBI612,UBI613,UBI614,UBI615,UBI616,UBI617,UBI618,UBI619,UBI620,UBI621,UBI622,UBI623,UBI624,UBI625,UBI626,UBI627,UBI628,UBI629,UBI630,UBI631,UBI632,UBI633,UBI634,UBI635,UBI636,UBI637,UBI638,UBI639,UBI640,UBI641,UBI642,UBI643,UBI644,UBI645,UBI646,UBI647,UBI648,UBI649,UBI650,UBI651,UBI652,UBI653,UBI654,UBI655,UBI656,UBI657,UBI658,UBI659,UBI660,UBI661,UBI662,UBI663,UBI664,UBI665,UBI666,UBI667,UBI668,UBI669,UBI670,UBI671,UBI672,UBI673,UBI674,UBI675,UBI676,UBI677,UBI678,UBI679,UBI680,UBI681,UBI682,UBI683,UBI684,UBI685,UBI686,UBI687,UBI688,UBI689,UBI690,UBI691,UBI692,UBI693,UBI694,UBI695,UBI696,UBI697,UBI698,UBI699,UBI700,UBI701,UBI702,UBI703,UBI704,UBI705,UBI706,UBI707,UBI708,UBI709,UBI710,UBI711,UBI712,UBI713,UBI714,UBI715,UBI716,UBI717,UBI718,UBI719,UBI720,UBI721,UBI722,UBI723,UBI724,UBI725,UBI726,UBI727,UBI728,UBI729,UBI730,UBI731,UBI732,UBI733,UBI734,UBI735,UBI736,UBI737,UBI738,UBI739,UBI740,UBI741,UBI742,UBI743,UBI744,UBI745,UBI746,UBI747,UBI748,UBI749,UBI750,UBI751,UBI752,UBI753,UBI754,UBI755,UBI756,UBI757,UBI758,UBI759,UBI760,UBI761,UBI762,UBI763,UBI764,UBI765,UBI766,UBI767,UBI768,UBI769,UBI770,UBI771,UBI772,UBI773,UBI774,UBI775,UBI776,UBI777,UBI778,UBI779,UBI780,UBI781,UBI782,UBI783,UBI784,UBI785,UBI786,UBI787,UBI788,UBI789,UBI790,UBI791,UBI792,UBI793,UBI794,UBI795,UBI796,UBI797,UBI798,UBI799,UBI800,UBI801,UBI802,UBI803,UBI804,UBI805,UBI806,UBI807,UBI808,UBI809,UBI810,UBI811,UBI812,UBI813,UBI814,UBI815,UBI816,UBI817,UBI818,UBI819,UBI820,UBI821,UBI822,UBI823,UBI824,UBI825,UBI826,UBI827,UBI828,UBI829,UBI830,UBI831,UBI832,UBI833,UBI834,UBI835,UBI836,UBI837,UBI838,UBI839,UBI840,UBI841,UBI842,UBI843,UBI844,UBI845,UBI846,UBI847,UBI848,UBI849,UBI850,UBI851,UBI852,UBI853,UBI854,UBI855,UBI856,UBI857,UBI858,UBI859,UBI860,UBI861,UBI862,UBI863,UBI864,UBI865,UBI866,UBI867,UBI868,UBI869,UBI870,UBI871,UBI872,UBI873,UBI874,UBI875,UBI876,UBI877,UBI878,UBI879,UBI880,UBI881,UBI882,UBI883,UBI884,UBI885,UBI886,UBI887,UBI888,UBI889,UBI890,UBI891,UBI892,UBI893,UBI894,UBI895,UBI896,UBI897,UBI898,UBI899,UBI900,UBI901,UBI902,UBI903,UBI904,UBI905,UBI906,UBI907,UBI908,UBI909,UBI910,UBI911,UBI912,UBI913,UBI914,UBI915,UBI916,UBI917,UBI918,UBI919,UBI920,UBI921,UBI922,UBI923,UBI924,UBI925,UBI926,UBI927,UBI928,UBI929,UBI930,UBI931,UBI932,UBI933,UBI934,UBI935,UBI936,UBI937,UBI938,UBI939,UBI940,UBI941,UBI942,UBI943,UBI944,UBI945,UBI946,UBI947,UBI948,UBI949,UBI950,UBI951,UBI952,UBI953,UBI954,UBI955,UBI956,UBI957,UBI958,UBI959,UBI960,UBI961,UBI962,UBI963,UBI964,UBI965,UBI966,UBI967,UBI968,UBI969,UBI970,UBI971,UBI972,UBI973,UBI974,UBI975,UBI976,UBI977,UBI978,UBI979,UBI980,UBI981,UBI982,UBI983,UBI984,UBI985,UBI986,UBI987,UBI988,UBI989,UBI990,UBI991,UBI992,UBI993,UBI994,UBI995,UBI996,UBI997,UBI998,UBI999,UBI1000
Pathways in cancer	8,24E-12	2,47E-08	121	395	ADCY3,AXIN2,FZD4,CUL2,PIK3R3,APC,XIAP,FASLG,ARNT,CCND1,BCL2,BCR,BMP2,CASP8,RUNX1,RUNX1T1,CBL,CCNE1,CCNE2,CDC42,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,CEBPA,COL4A1,ROCK2,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,CRK,CRKL,TRAF4,APPL1,CTNNA1,CTNNA2,CTNNA3,CTNNA4,CTNNA5,CTNNA6,CTNNA7,CTNNA8,CTNNA9,CTNNA10,CTNNA11,CTNNA12,CTNNA13,CTNNA14,CTNNA15,CTNNA16,CTNNA17,CTNNA18,CTNNA19,CTNNA20,CTNNA21,CTNNA22,CTNNA23,CTNNA24,CTNNA25,CTNNA26,CTNNA27,CTNNA28,CTNNA29,CTNNA30,CTNNA31,CTNNA32,CTNNA33,CTNNA34,CTNNA35,CTNNA36,CTNNA37,CTNNA38,CTNNA39,CTNNA40,CTNNA41,CTNNA42,CTNNA43,CTNNA44,CTNNA45,CTNNA46,CTNNA47,CTNNA48,CTNNA49,CTNNA50,CTNNA51,CTNNA52,CTNNA53,CTNNA54,CTNNA55,CTNNA56,CTNNA57,CTNNA58,CTNNA59,CTNNA60,CTNNA61,CTNNA62,CTNNA63,CTNNA64,CTNNA65,CTNNA66,CTNNA67,CTNNA68,CTNNA69,CTNNA70,CTNNA71,CTNNA72,CTNNA73,CTNNA74,CTNNA75,CTNNA76,CTNNA77,CTNNA78,CTNNA79,CTNNA80,CTNNA81,CTNNA82,CTNNA83,CTNNA84,CTNNA85,CTNNA86,CTNNA87,CTNNA88,CTNNA89,CTNNA90,CTNNA91,CTNNA92,CTNNA93,CTNNA94,CTNNA95,CTNNA96,CTNNA97,CTNNA98,CTNNA99,CTNNA100,CTNNA101,CTNNA102,CTNNA103,CTNNA104,CTNNA105,CTNNA106,CTNNA107,CTNNA108,CTNNA109,CTNNA110,CTNNA111,CTNNA112,CTNNA113,CTNNA114,CTNNA115,CTNNA116,CTNNA117,CTNNA118,CTNNA119,CTNNA120,CTNNA121,CTNNA122,CTNNA123,CTNNA124,CTNNA125,CTNNA126,CTNNA127,CTNNA128,CTNNA129,CTNNA130,CTNNA131,CTNNA132,CTNNA133,CTNNA134,CTNNA135,CTNNA136,CTNNA137,CTNNA138,CTNNA139,CTNNA140,CTNNA141,CTNNA142,CTNNA143,CTNNA144,CTNNA145,CTNNA146,CTNNA147,CTNNA148,CTNNA149,CTNNA150,CTNNA151,CTNNA152,CTNNA153,CTNNA154,CTNNA155,CTNNA156,CTNNA157,CTNNA158,CTNNA159,CTNNA160,CTNNA161,CTNNA162,CTNNA163,CTNNA164,CTNNA165,CTNNA166,CTNNA167,CTNNA168,CTNNA169,CTNNA170,CTNNA171,CTNNA172,CTNNA173,CTNNA174,CTNNA175,CTNNA176,CTNNA177,CTNNA178,CTNNA179,CTNNA180,CTNNA181,CTNNA182,CTNNA183,CTNNA184,CTNNA185,CTNNA186,CTNNA187,CTNNA188,CTNNA189,CTNNA190,CTNNA191,CTNNA192,CTNNA193,CTNNA194,CTNNA195,CTNNA196,CTNNA197,CTNNA198,CTNNA199,CTNNA200,CTNNA201,CTNNA202,CTNNA203,CTNNA204,CTNNA205,CTNNA206,CTNNA207,CTNNA208,CTNNA209,CTNNA210,CTNNA211,CTNNA212,CTNNA213,CTNNA214,CTNNA215,CTNNA216,CTNNA217,CTNNA218,CTNNA219,CTNNA220,CTNNA221,CTNNA222,CTNNA223,CTNNA224,CTNNA225,CTNNA226,CTNNA227,CTNNA228,CTNNA229,CTNNA230,CTNNA231,CTNNA232,CTNNA233,CTNNA234,CTNNA235,CTNNA236,CTNNA237,CTNNA238,CTNNA239,CTNNA240,CTNNA241,CTNNA242,CTNNA243,CTNNA244,CTNNA245,CTNNA246,CTNNA247,CTNNA248,CTNNA249,CTNNA250,CTNNA251,CTNNA252,CTNNA253,CTNNA254,CTNNA255,CTNNA256,CTNNA257,CTNNA258,CTNNA259,CTNNA260,CTNNA261,CTNNA262,CTNNA263,CTNNA264,CTNNA265,CTNNA266,CTNNA267,CTNNA268,CTNNA269,CTNNA270,CTNNA271,CTNNA272,CTNNA273,CTNNA274,CTNNA275,CTNNA276,CTNNA277,CTNNA278,CTNNA279,CTNNA280,CTNNA281,CTNNA282,CTNNA283,CTNNA284,CTNNA285,CTNNA286,CTNNA287,CTNNA288,CTNNA289,CTNNA290,CTNNA291,CTNNA292,CTNNA293,CTNNA294,CTNNA295,CTNNA296,CTNNA297,CTNNA298,CTNNA299,CTNNA300,CTNNA301,CTNNA302,CTNNA303,CTNNA304,CTNNA305,CTNNA306,CTNNA307,CTNNA308,CTNNA309,CTNNA310,CTNNA311,CTNNA312,CTNNA313,CTNNA314,CTNNA315,CTNNA316,CTNNA317,CTNNA318,CTNNA319,CTNNA320,CTNNA321,CTNNA322,CTNNA323,CTNNA324,CTNNA325,CTNNA326,CTNNA327,CTNNA328,CTNNA329,CTNNA330,CTNNA331,CTNNA332,CTNNA333,CTNNA334,CTNNA335,CTNNA336,CTNNA337,CTNNA338,CTNNA339,CTNNA340,CTNNA341,CTNNA342,CTNNA343,CTNNA344,CTNNA345,CTNNA346,CTNNA347,CTNNA348,CTNNA349,CTNNA350,CTNNA351,CTNNA352,CTNNA353,CTNNA354,CTNNA355,CTNNA356,CTNNA357,CTNNA358,CTNNA359,CTNNA360,CTNNA361,CTNNA362,CTNNA363,CTNNA364,CTNNA365,CTNNA366,CTNNA367,CTNNA368,CTNNA369,CTNNA370,CTNNA371,CTNNA372,CTNNA373,CTNNA374,CTNNA375,CTNNA376,CTNNA377,CTNNA378,CTNNA379,CTNNA380,CTNNA381,CTNNA382,CTNNA383,CTNNA384,CTNNA385,CTNNA386,CTNNA387,CTNNA388,CTNNA389,CTNNA390,CTNNA391,CTNNA392,CTNNA393,CTNNA394,CTNNA395,CTNNA396,CTNNA397,CTNNA398,CTNNA399,CTNNA400
Signaling by EGFR	6,81E-14	2,04E-10	120	367	ADAM10,ADCY3,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CBL,CD28,CDC42,CDKN1A,CDKN1B,CREB1,LRIG1,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,EPH2,SPRY1,SPRY2,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,PTPN3,PTPRK,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,SH3GL2,PHLPP2,SOS1,PAG1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,PSME4,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,RICTOR,RASGEF1A,ADAM12

Signaling by PDGF	8,45E-13	2,53E-09	120	379	ADCY3,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,COL4A1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL6A3,COL9A1,CREB1,CRK,CRKL,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,FURIN,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PSME4,PDGFC,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,RICTOR,RASGEF1A
Fc epsilon receptor (FCER1) signaling	2,95E-12	8,83E-09	119	381	CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,BTRC,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,CREB1,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,FOS,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,TAB3,IKBKB,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,JUN,MARK3,MAP3K1,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,NFATC3,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PPP3CA,PPP3CB,PPP3R1,MAPK1,MAPK3,MAPK9,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,MAP2K4,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,TAB2,PSME4,FBXW11,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,UBE2D1,UBE2V1,VAV2,RICTOR,RASGEF1A
PI3K-Akt signaling pathway	1,05E-12	3,14E-09	111	342	PIK3R3,ITGA10,FASLG,CCND1,BCL2,CCND2,CCND3,CCNE1,CCNE2,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,CHRM2,COL1A1,COL1A2,EIF4E2,COL2A1,COL4A

					1,COL4A2,COL4A3,COL4A4,COL4A5,COL6A3,COL9A1,CREB1,ATF2,CREB5,CSF1,AKT3,BCL2L11,EFNA5,EIF4B,EIF4E,EPO,F2R,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGF11,FGFR1,FOXO3,FLT1,GNB5,GHR,YWHAQ,LPAR4,GYS1,IGF1,IGF1R,IKBKB,INSR,ITGA6,IRS1,ITGA2,ITGA4,ITGA5,ITGA9,ITGAV,ITGB1,ITGB3,ITGB8,JAK1,KDR,LAMA2,LAMA3,LAMB3,LAMC1,MCL1,MYB,OSM,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,PIK3R1,DDIT4,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R2A,PPP2R5C,PPP2R5E,PKN2,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,RELN,PTEN,RAF1,RBL2,RPS6KB1,SGK1,PHLPP2,SOS1,SOS2,STK11,GNG12,PDGFC,TEK,TP53,HSP90B1,TSC1,SGK3,CREB3L2,VEGFA,YWHAH,YWHAG,YWHAZ
Down stream signal transduction	1,50E-11	4,50E-08	111	355	ADCY3,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,CREB1,CRK  CRKL,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,SATAT3,PSME4,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,RICTOR,RASGEF1A
DAP12 signaling	1,65E-10	4,95E-07	109	359	ADCY3,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,CREB1,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,

PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,PSME4,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VAV2,RICTOR,RASGEF1A

DAP12 interactions	2,26E-09	6,76E-06	109	374	<p>ADCY3,CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CD28,CDKN1A,CDKN1B,CREB1,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,F</p> <p>GFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,AHCYL1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,ITPR1,JAK1,MARK3,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,PRKACB,PRKAR1A,PRKAR2A,PRKAR2B,PRKCE,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,PSME4,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,VAV2,RICTOR,RASGEF1A</p>
Diseases of signal transduction	1,67E-08	5,02E-05	106	373	<p>AMER1,ADAM10,FZD4,MIB1,PIK3R3,APC,IRS2,BCR,IQGAP1,KAT2B,CBL,CCNC,CD28,LRRFIP1,CDKN1A,CDKN1B,NAPEPLD,ZFYVE9,CLCN6,QQKI,CREB1,NCOR2,CSK,CTNNB1,CUX1,HDAC4,AKT3,BCL2L11,HBEGF,DERL2,AKAP9,PSME3,PSMD14,EP300,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FKBP1A,FOXO1,FOXO3,ATG7,GAB1,FRS2,ERLIN2,NRG1,HES1,IHH,IRS1,ITGB3,DLL1,LRP6,SMAD2,SMAD3,MARK3,MAP3K11,NF1,NOTCH1,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,DLL4,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,MAPK1,MAPK3,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,ESRP1,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,RNF43,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,TBL1XR1,FBXW7,MYO18A,TNKS2,SOS1,STAT3,PSME4,TBL1X,TGFBR2,MACF1,KDM7A,VCP,RICTOR,ZMYM2,FZD5,WNT3A,FXR1</p>

Signaling by SCF-KIT	1,21E-10	3,64E-07	105	340	<p>CUL3,PIK3R3,TNRC6C,TRIB3,LAMTOR3,IRS2,PEA15,IQGAP1,CALM1,CALM3,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2G,CBL,CD28,CDKN1A,CDKN1B,CHEK1,SOCS6,CREB1,CSK,RAPGEF2,AKT3,HBEGF,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP6,DUSP8,DUSP9,RANBP9,AGO1,AKAP9,PSME3,PSMD14,ERBB3,EREG,FGF2,FGF5,FGF7,FGF9,FGFR1,FOXO1,FOXO3,GAB1,FRS2,TNRC6A,GRIN1,DUSP10,NRG1,INSR,IRS1,ITGB3,JAK1,MARK3,AGO4,MAP3K11,NEFL,NF1,PAQR3,PDGFA,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,ICOS,PIK3R1,PIP4K2A,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A</p> <p>,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP2R5E,MAPK1,MAPK3,IL17RD,MAP2K1,DAB2IP,PSMA2,PSMB8,PSMD7,PSMD11,PSMD12,PTEN,RAF1,RAP1A,RAP1B,RASA1,RET,SPRED1,PIP4K2C,PHLPP2,SOS1,SPTAN1,SPTBN2,TNRC6B,STAT3,PSME4,TEK,PIP5K1C,DUSP16,TP53,RICTOR,YES1,RASGEF1A</p>
----------------------	----------	----------	-----	-----	--

**Anexo 9.** Principais vias de sinalização significativas na RCU em pacientes não respondedores vs controle.

Via molecular	p	q ajustado Bonferroni	n° genes	n° total genes na via	genes-alvo participantes da via
Pathways in cancer	2,89E-14	7,35E-11	78	395	MAX,ETS1,ADCY1,ADCY2,ADCY6,ADCY9,FZD6,MET,KITLG,MITF,FGF5,FGF7,MMP1,FOXO1,FOS,PIK3R3,SLC2A1,SMO,SOS1,SOS2,CCND1,BCL2,BCL2L1,STAT3,STAT5B,RALBP1,GLI2,PLCB1,GNAI3,GNAQ,GNB1,NRAS,ARHGEF12,RUNX1,RUNX1T1,CBL,TGFA,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,RASSF1,CDC42,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,HSP90B1,PDGFRA,CHUK,PIK3CA,COL4A1,ROCK2,WNT1,WNT10B,IGF1,IGF1R,PRKACB,PRKCA,CTBP2,CTNNA1,CTNNB1,IKBKB,MAP2K1,LAMA1,PTEN,PTGER2,JUN,CXCR4,KIT,RAF1,RB1,FZD3,LAMA4,E2F3,CCDC6,ROCK1,EP300,EPAS1,SMAD2
PI3K-Akt signaling pathway	3,62E-07	9,19E-04	55	342	RPS6KB1,MET,KITLG,FGF5,FGF7,ITGA11,PIK3R3,SOS1,SOS2,CCND1,BCL2,BCL2L1,GHR,YWHAQ,GNB1,NRAS,TEK,CCND2,THBS1,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,HSP90B1,PDGFRA,CHUK,PIK3CA,CREB3L2,COL1A2,COL2A1,COL4A1,DDIT4,COL6A3,YWHAB,YWHAG,PPP2CA,IGF1,PPP2R5C,IGF1R,PPP2R5D,CSF1,PRKAA1,PRKCA,PKN2,IKBKB,MAP2K1,LAMA1,ITGA5,PTEN,ITGA9,ITGB8,KIT,RAF1,BCL2L11,LAMA4,EIF4B
MicroRNAs in cancer	8,96E-07	2,28E-03	49	299	ERBB3,MDM4,MET,SHC1,IGF2BP1,FOXP1,SOS1,SOS2,CCND1,BCL2,BCL2L2,STAT3,BMI1,BMP2,NOTCH1,ZEB1,NRAS,DICER1,ZFP281,CCND2,TGFB2,THBS1,RASSF1,CDC25B,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,RPS6KA5,PDGFRA,HOXD10,PIK3CA,DDIT4,PRKCA,IKBKB,MAP2K1,HDAC4,ITGA5,PTEN,ZEB2,DNMT1,DNMT3B,RAF1,BCL2L11,FZD3,E2F3,HMGA2,ROCK1,EP300,MARCKS
HTLV-I infection	4,74E-08	1,21E-04	47	256	ETS1,ADCY1,ADCY2,ADCY6,ADCY9,FZD6,MRAS,SLC25A4,FOS,PIK3R3,SLC2A1,MYBL1,CCND1,BCL2L1,STAT5B,NRP1,KAT2B,NFATC3,TBP,NRAS,CALR,CANX,CCND2,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,CDKN1A,PDGFRA,CH

						UK,PIK3CA,VDAC2,WNT1,WNT10B,CREM,PPP3CB,PPP3R1,PRKACB,CTNNB1,IKBKB,IL15,JUN,RB1,FZD3,E2F3,EP300,MAD2L1,SMAD2
Proteoglycans cancer	in	6,54E-10	1,66E-06	44	203	ERBB3,ERBB4,ESR1,RPS6KB1,FZD6,MET,MRAS,ANK1,ANK2,ANK3,PIK3R3,SMO,SOS1,SOS2,PPP1R12A,CCND1,STAT3,NRAS,CAMK2A,CAMK2D,ARHGEF12,CBL,TGFB2,THBS1,CDC42,CDKN1A,HOXD10,PIK3CA,ROCK2,WNT1,WNT10B,PPP1CB,IGF1,IGF1R,PRKACB,PRKCA,CTNNB1,MAP2K1,ITGA5,RAF1,FZD3,EIF4B,ROCK1,SMAD2
FoxO signaling pathway		5,07E-10	1,29E-06	34	132	PRKAG2,FOXO1,PIK3R3,NLK,SOS1,SOS2,CCND1,STAT3,NRAS,GRM1,CCND2,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,PIK3CA,HOMER1,IGF1,IGF1R,PRKAA1,IKBKB,MAP2K1,IL10,PTEN,GADD45A,USP7,RAF1,RAG1,BCL2L11,S1PR1,EP300,SMAD2
Breast cancer		5,87E-09	1,49E-05	34	144	ESR1,RPS6KB1,FZD6,FGF5,FGF7,FOS,PIK3R3,SHC1,TNFSF11,NCOA1,SOS1,SOS2,CCND1,NOTCH1,NRAS,CDK6,CDKN1A,PIK3CA,DLL4,WNT1,WNT10B,IGF1,IGF1R,CTNNB1,MAP2K1,PTEN,JAG2,JUN,KIT,RAF1,RB1,FZD3,E2F3,DLL1
Hipposignaling pathway		3,56E-08	9,05E-05	34	154	FZD6,MOB1B,BBC3,CCND1,PARD6B,BMPR1A,BMPR2,GLI2,YWHAQ,LIMD1,TEAD1,CCND2,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,MPP5,RASSF1,SERPINE1,AJUBA,GDF6,AMOT,WNT1,WNT10B,YWHAB,YWHAG,PPP1CB,PPP2CA,PRKCZ,CTNNA1,CTNNB1,DLG2,FZD3,LATS2,SMAD2
Endocrine resistance		2,94E-11	7,47E-08	30	96	ESR1,RPS6KB1,ADCY1,ADCY2,ADCY6,ADCY9,FOS,PIK3R3,SHC1,SOS1,SOS2,CCND1,BCL2,NOTCH1,NRAS,CDKN1A,CDKN1B,PIK3CA,DLL4,MED1,IGF1,IGF1R,PRKACB,MAP2K1,JAG2,JUN,RAF1,RB1,E2F3,DLL1
EGF receptor signaling pathway		6,69E-09	1,70E-05	29	111	ERBB3,ERBB4,MAP3K4,MAP3K5,MRAS,SHC1,SOS1,SOS2,STAT3,STAT5B,NF1,YWHAQ,NRAS,CBL,TGFA,PRKD3,PIK3C2A,PIK3CA,RASAL2,YW

					HAB,YWHAG,PPP2CA,PPP2R5C,PPP2R5D,PRKCA,PRKCZ,MAP2K1,RAF1,RASA1
Hepatitis B	2,65E-06	6,72E-03	29	144	FOS,PIK3R3,CCND1,BCL2,STAT3,STAT5B,NFATC3,YWHAQ,NRAS,TGFB2,TGFBR1,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,PIK3CA,CREB3L2,YWHAB,PRKCA,IKBKB,MAP2K1,PTEN,DDX3X,JUN,RAF1,RB1,E2F3,EGR3,EP300
Angiogenesis	6,18E-06	1,57E-02	29	150	ETS1,F3,FOS,PIK3R3,SHC1,SOS1,SOS2,STAT3,NOTCH1,NRAS,TEK,PDGFRA,PRKD3,PIK3C2A,PIK3CA,DLL4,WNT1,WNT10B,PRKCA,PRKCZ,CTNNB1,JAG2,JUN,RAF1,RASA1,FZD3,DLL1,EFNB2,EPHA3
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3,90E-06	9,91E-03	28	139	ACVR1,ACVR2A,ACVR2B,FZD6,PIK3R3,ZFHX3,STAT3,BMI1,BMPR1A,BMPR2,NRAS,KLF4,PIK3CA,WNT1,WNT10B,ID4,IGF1,IGF1R,CTNNB1,MAP2K1,IL6ST,INHBB,JARID2,RAF1,FZD3,KAT6A,SMAD2,SMAD5
Prostate cancer	9,05E-09	2,30E-05	25	87	FOXO1,PIK3R3,SOS1,SOS2,CCND1,BCL2,NRAS,TGFA,CDKN1A,CDKN1B,HSP90B1,PDGFRA,CHUK,PIK3CA,CREB3L2,IGF1,IGF1R,CTNNB1,IKBKB,MAP2K1,PTEN,RAF1,RB1,E2F3,EP300
Chronic myeloid leukemia	4,57E-10	1,16E-06	24	71	PIK3R3,SHC1,SOS1,SOS2,CCND1,BCL2L1,STAT5B,NRAS,RUNX1,CBL,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,CDK6,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,PIK3CA,CTBP2,IKBKB,MAP2K1,RAF1,RB1,E2F3
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	1,30E-07	3,30E-04	22	79	ERBB3,RPS6KB1,MET,PIK3R3,SHC1,SOS1,SOS2,BCL2,BCL2L1,STAT3,NF1,NRAS,TGFA,PDGFRA,PIK3CA,IGF1,IGF1R,PRKCA,MAP2K1,PTEN,RAF1,BCL2L1
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	8,11E-06	2,06E-02	22	99	F3,FOXO1,PIK3R3,CCND1,BCL2,STAT3,STAT5B,PLCB1,NRAS,TGFB2,TGFBR1,TGFBR2,SERPINE1,CDC42,CDKN1B,PIK3CA,COL1A2,COL4A1,PRKCA,PRKCZ,JUN,SMAD2

Acutemyeloid leukemia	3,57E-06	9,07E-03	16	55	RPS6KB1,PIK3R3,SOS1,SOS2,CCND1,STAT3,STAT5B,NRAS,RUNX1,RUNX1T1,CHUK,PIK3CA,IKBKB,MAP2K1,KIT,RAF1
-----------------------	----------	----------	----	----	--

