



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

Cristiane de Oliveira

Avaliação da Expressão de EGFL7 em Câncer Colorretal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Patologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto
Coorientador(a): Prof. Dr. Rui Reis

**Botucatu
2022**

Cristiane de Oliveira

Avaliação da Expressão de EGFL7 em Câncer Colorretal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Patologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto
Coorientador(a): Prof. Dr. Rui Reis

Botucatu
2022

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

Oliveira, Cristiane de.

Avaliação da expressão de EGFL7 em câncer colorretal /
Cristiane de Oliveira. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Lucas Tadeu Bidinotto

Coorientador: Rui Reis

Capes: 40105008

1. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Imuno-histoquímica.
3. Neovascularização. 4. Carcinogênese. 5. Análise in
silico.

Palavras-chave: Análise in silico; Câncer colorretal;
EGFL7.

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da CAPES.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, baseando-se no Regimento do Programa e no Manual de Apresentação de Dissertação e Teses do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Além disso, todos os experimentos realizados nesse estudo foram realizados em parceria com o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos, respeitando todos os protocolos do laboratório e em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas nesse estudo são de responsabilidade dos autores. Por fim, os pesquisadores declaram não haver qualquer conflito de interesse relacionado ao presente estudo.

Dedico esse trabalho ao meu esposo Wellington Oliveira dos Santos...

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi possível graças à dedicação, apoio e perseverança de algumas pessoas, gostaria de deixar aqui minha profunda gratidão a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para conclusão desse trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente por todo apoio e paciência do meu amado esposo **Wellington**, com quem pude compartilhar minhas frustrações e angústias e de quem pude ouvir conselhos que enriqueceram esse trabalho. Seu companheirismo e paciência foram primordiais para que eu pudesse desenvolver um bom trabalho. Sua experiência como pesquisador também foi essencial para que eu pudesse ter um norte quando me via na escuridão. Muito obrigada por tudo, principalmente pelas inúmeras vezes em que me lembrou de que era necessário que eu desse o melhor de mim. Obrigada por ser esse esposo incrível, amoroso, companheiro e que sempre me estimula a ser melhor do que sou hoje.

Gostaria também de agradecer a minha **família**, que sempre me apoiou. Sou imensamente grata a tudo que fizeram para que eu me tornasse o que sou hoje. Ao meu querido **pai**, que sempre se esforçou ao máximo para que eu pudesse ter uma boa formação, por todo suor e lágrimas derramadas sobre os telhados das casas que ele construiu com tanto esforço, muito obrigada! À minha amada **mãe**, que apesar de não estar comigo nesse momento tão importante, sempre estará em meu coração, tudo que sou hoje devo a ela, cada gota do meu ser reflete seu espírito guerreiro e alegre, esteja onde estiver espero que possa estar me vendo agora e possa estar sorrindo da sua forma tão doce e carinhosa. Se cheguei até aqui, foi graças a perseverança que sempre teve para garantir que eu tivesse uma boa formação acadêmica. Sua forma de ver a vida sempre me inspiraram aonde quer que eu vá!

Ao meu orientador, **Dr. Lucas Tadeu Bidinotto**, sinceramente não sei por onde começar a agradecer a imensa dedicação, apoio e paciência. Para o desenvolvimento desse trabalho foram necessários muitos esforços para superar cada um dos muitos obstáculos que tivemos, e em nenhum momento você pensou em desistir de mim ou desse estudo, apenas por isso já tenho motivos para te agradecer. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, por todos os conselhos, por toda sua orientação, por jamais desistir e por todas as ricas discussões que tivemos durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por tudo!

Ao meu coorientador **Dr. Rui Reis**, por todo conhecimento e incentivo, por todas as discussões e orientações necessárias para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por todo conhecimento profissional e por acreditar no meu trabalho.

Gostaria de agradecer também aos membros da **Banca de Qualificação** por todas as sugestões e pela arguição tão fluida e enriquecedora, **Dra. Patrícia Pintor dos Reis** e **Dr. Adhemar Longatto**.

Aos membros da **Banca de Defesa**, meu profundo agradecimento pelo tempo dedicado à leitura, interpretação e avaliação dessa dissertação.

Meus mais sinceros agradecimentos à **Coordenação do Programa de Pós-graduação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu**, especialmente às **Dra. Márcia Guimarães da Silva** e **Vânia Amaral Soler**, pelo incrível trabalho e por todo esforço realizado para que esse trabalho fosse concluído. Meu muito obrigada!

Agradeço também a toda equipe do **Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos**, por permitirem que os experimentos deste estudo fossem realizados com excelência e com toda infraestrutura necessária. Meu muito obrigada às **Biologistas Dra. Izabela Faria e Karina Mello Pepineli**, pela disponibilidade e colaboração. Aos pesquisadores **Dra. Leticia Ferro Leal** e **Dr. Renato Oliveira**, pelos conselhos e discussões importantes que nos deram um norte em momentos de incertezas. Muito obrigada pela colaboração de todos vocês, esse trabalho foi imensamente enriquecido pela sabedoria e dedicação de vocês.

Aos **Patologistas do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos**, **Dr. Gabriel Limone** e **Dr. Vinicius Duval da Silva**, pelo tempo dedicado à leitura e interpretação das lâminas histológicas, além de todo ensinamento durante o processo. Muito obrigada, tudo que aprendi levarei para a vida.

À minha amiga de bancada, de grupo de pesquisa e da vida, **Paola**, por compartilhar comigo toda frustração e sofrimento nas milhares de tentativas com Western blot e todos os experimentos de bancada. Você foi essencial e sem você jamais teria conseguido concluir esse trabalho com sucesso. Muito obrigada!

À todos os **Meus Amigos** por estarem comigo em cada instante e por sempre acreditarem em mim. Por sempre me lembrarem que sou alcançar todos os meus sonhos, pois sempre estarão ao meu lado me apoiando e torcendo por mim. Um agradecimento especial à **Dani Pessoa, Dani Cardoso, André, Renata, Ângela e José Guilherme**, vocês são especiais para mim, obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao **Coral Acordes Vocais do Instituto Sociocultural do Hospital de Câncer de Barretos**, por proporcionarem momentos em que meu coração se acalmava e vibrava de emoção, sou grata em fazer parte desse projeto tão lindo e por todos os amigos que fiz durante todos esses anos nesse grupo tão querido. Um agradecimento especial para a **Maestrina Angélica**, para **Luciane e José Renato**, vocês têm um lugar especial em minha vida.

Finalmente, meu mais sincero agradecimento a todos que direta e indiretamente colaboraram para o meu crescimento profissional, pessoal e para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE EGFL7 EM CÂNCER COLORRETAL

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIACÕES	15
ABSTRACT	19
RESUMO	20
INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	44
Amostragem.....	46
Imunohistoquímica.....	47
Análise estatística.....	48
Análises <i>in silico</i>	49
RESULTADOS	51
Análise de imunohistoquímica.....	51
Análises <i>in silico</i>	56
DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	78
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características fundamentais do câncer. Imagem retirada e adaptada de Hanahan (4)	24
Figura 2: Incidência de casos para 2020 dos principais tipos de câncer segundo INCA (2).....	25
Figura 3: Principais fatores risco para CCR. Imagem retirada e adaptada de Dekker et. al. (3).....	26
Figura 4: Esquema simplificado do desenvolvimento do CCR. Imagem retirada e adaptada de Kuipers et. al. (1)	28
Figura 5: Alterações mais frequentes em cada subtipo de CCR. Imagem retirada e adaptada de Guinney et. al. (24).....	29
Figura 6: Esquema simplificado com as principais características dos tumores localizados no cólon proximal/direito e distal/esquerdo. Imagem retirada e adaptada de Dekker et. al. (3).....	31
Figura 7: Esquema simplificado da montagem da vasculatura. Imagem retirada e adaptada de Adams et.al. (49)	35
Figura 8: Esquema simplificado do mecanismo de formação de vasos sanguíneos. Imagem retirada e adaptada de Lugano et. al. (54).	36
Figura 9: Esquema simplificado das etapas da angiogênese. Imagem retirada e adaptada de Adams et. al. (49)	36
Figura 10: Esquema simplificado da morfologia dos vasos sanguíneos tumorais. Imagem retirada e adaptada de Lugano et. al. (54)	37
Figura 11: Esquema simplificado da estrutura genica e proteica de EGFL7. Imagem retirada e adaptada de Stanković et. al. (69).....	41
Figura 12: Esquema simplificado das principais vias que regulam a angiogênese através da ação de EGFL7. Imagem retirada e adaptada de Hong et al. (63)	42

Figura 13: Esquema simplificado da ação das drogas Bevacizumabe e Parsatuzumabe nas células endoteliais. **Fonte:** Imagens retiradas e adaptadas de: <https://www.creativebiolabs.net/bevacizumab-overview.htm> (acesso: 15/03/2022) e <https://www.creativebiolabs.net/parsatuzumab-overview.htm> (acesso: 15/03/2022).44

Figura 14: Fluxograma dos materiais e métodos realizados nesse estudo.45

Figura 15. Reação de imunohistoquímica para a proteína EGFL7 em tissue microarray de tecidos normais (20x). A) parênquima cerebral; B) cólon; C) rim; D) túbulos seminíferos.....47

Figura 16: Reação de Imunohistoquímica para a proteína EGFL7 em tissue microarray dos 487 pacientes (400x): A) Tecido tumoral de cólon com baixa expressão; B) Tecido tumoral de cólon com alta expressão; C) Tecido normal do cólon com baixa expressão; D) Tecido normal do cólon com alta expressão.....51

Figura 17: Sobrevida livre de doença e global dos pacientes diagnosticados com CCR considerando a expressão de EGFL7. (A) Sobrevida livre de doença dos 463 pacientes com CCR. (B) Sobrevida global dos 463 pacientes com CCR. (C e D) Sobrevida livre de doença e global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no cólon direito. (E e F) Sobrevida livre de doença e global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no cólon esquerdo. (G e H) Sobrevida livre de doença e global dos pacientes com adenocarcinoma de reto.....55

Figura 18: Sobrevida global dos pacientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA) diagnosticados com câncer de cólon baseado na expressão de EGFL7 analisada por sequenciamento de RNA.57

Figura 19: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com alta expressão de EGFL759

Figura 20: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com baixa expressão de EGFL7.60

Figura 21: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos em comum nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com alta e baixa expressão de EGFL7.61

Figura 22: Principais vias enriquecidas na análise no KEGG realizada a partir dos genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com alta expressão de EGFL7 vs expressão normal e baixa expressão de EGFL7 vs expressão normal.....62

Figura 23: Gráficos de sobrevida global considerando a expressão de EGFL7 em pacientes com adenocarcinoma de cólon. A) Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no lado esquerdo. B) Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no lado direito.65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Associação entre os principais dados clínicos dos 463 pacientes diagnosticados com CCR e a análise da marcação imunohistoquímica para expressão de EGFL7.....	52
Tabela 2: Associação entre os principais dados patológicos dos 463 pacientes diagnosticados com CCR e a análise da marcação Imunohistoquímica para expressão de EGFL7.....	53
Tabela 3: Associação entre expressão de EGFL7 e marcadores de angiogênese...54	
Tabela 4: Expressão gênica em pacientes diagnosticados com câncer de cólon e câncer reto.	56
Tabela 5: Número de genes diferencialmente expressos considerando como contrastes os pacientes com alta expressão de EGFL7 vs. expressão normal e baixa expressão de EGFL7 vs. expressão normal nos casos do The Cancer Genome Atlas.	58
Tabela 6: Hallmarks enriquecidos no grupo com alta expressão de EGFL7 em relação ao grupo com expressão normal	64

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

- Tabela Suplementar 1:** Genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta expressão de EGFL7.....78
- Tabela Suplementar 2:** Genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com baixa expressão de EGFL7.....94
- Tabela Suplementar 3:** Comparação entre as os genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta e baixa expressão de EGFL7.....111
- Tabela Suplementar 4:** Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta expressão de EGFL7.....115
- Tabela Suplementar 5:** Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com baixa expressão de EGFL7.....122
- Tabela Suplementar 6:** Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta e baixa expressão de EGFL7.133
- Tabela Suplementar 7:** Principais vias enriquecidos na análise no KEEG realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta expressão de EGFL7.....137
- Tabela Suplementar 8:** Principais vias enriquecidos na análise no KEEG realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com baixa expressão de EGFL7...140
- Tabela Suplementar 9:** Estimativa de infiltrados imunes nas lesões acometidas no lado direito nos pacientes com alta expressão de EGFL7 vs. expressão normal. ..142

LISTA DE ABREVIações

5FU = 5-fluorouracil

aCGH = do inglês *Microarray-based Comparative Genomic Hybridization* (Hibridização Genômica Comparativa)

AKT = RAC-alfa serina/threonina-proteína quinase

Anti-EGFL7 = Anticorpo anti EGFL7

anti-EGFR = Anticorpo anti EGFR

Anti-VEGF = Anticorpo anti VEGF

APC = do inglês *Adenomatous polyposis coli*

BRAF = *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

CAF = do inglês *Cancer associated fibroblasts* (Fibroblastos associados ao câncer)

CCR = Câncer Colorretal

CE = Células Endoteliais

CEA = Antígeno carcinoembrionário

CEP = Centro de pesquisa ética

CIMP = Hipermetilação de Ilhas CpG

CIN = do inglês *Chromosomal instability* (Instabilidade Cromossômica)

cir-EGFL7 = EGFL7 circulante

CMSs = do inglês *Consensus Molecular Subtypes* (Subtipos Moleculares Consensual)

COAD = do inglês *Colon Adenocarcinoma* (Adenocarcinoma de cólon)

CPEs = Células Progenitoras Endoteliais

CpG = 5'citosina-fosfato-guanina-3'

CPOM = Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular

DII4 = Delta-like 4

DNA = do inglês *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

eBayes = do inglês *Empirical Bayes Statistics for Differential Expression*

EGFL7 (gene) = do inglês EGF Like Domain Multiple 7 (Domínio semelhante a fator de crescimento epidérmico 7)

EGFL7 (proteína) = do inglês EGF Like Domain Multiple 7 (Domínio semelhante a fator de crescimento epidérmico 7)

EGFR = Receptor de fator de crescimento epidérmico

EMT = Transição Epitélio-Mesenquimal

EPCAM = do inglês *Epithelial cellular adhesion molecule* (Molécula de adesão celular epitelial)

ERK = do inglês *Extracellular signal-regulated kinase* (Quinase regulada por sinal extracelular)

ERK1 = do inglês *Extracellular signal-regulated kinase1* (Quinase regulada por sinal extracelular 1)

ERK2 = do inglês *Extracellular signal-regulated kinase 2* (Quinase regulada por sinal extracelular 2)

FAK = Adesão cinase focal

FDR = do inglês *False Discovery Rate*

FGF = Fator de crescimento de fibroblastos

FGF-2 = Fator de crescimento de fibroblastos 2

FGFR-1 = Receptor de fator de crescimento de fibroblastos 1

FGFRs = Receptores de fator de crescimento de fibroblastos

fgsea = do inglês *Fast Gene Set Enrichment Analysis*

FOLFIRI = Irinotecano, 5FU e Lv

FOLFOX = Oxaliplatina (OX), 5-fluorouracil (5FU) e Leucovorina (Lv)

GO = do inglês *Enriched Gene Ontology* (Enriquecimento de Ontologia genica)

Her2 = Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2

HLA = do inglês *Human Leucocyte Antigen* (Antígeno Leucocitário Humano)

H-Ras = Vírus do sarcoma de rato Harvey

IMC = Índice de massa corporal

JAK = Janus quinase

KEGG = do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KPS = do inglês *Karnofsky Performance Score*

KRAS = Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato v-Ki-ras2 Kirsten

Lv = Leucovorina

MAPK = do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases* (Proteíno-quinases ativadas por mitógenos)

mCCR = do inglês *Metastatic colorectal cancer* (Câncer colorretal metastático)

MEC = Matriz extracelular

MHC-I = do inglês *Histocompatibility class I* (Classe de histocompatibilidade I)

MHC-II = do inglês *Histocompatibility class II* (Classe de histocompatibilidade II)

miR-126 = Micro RNA-126

MLH1 = do inglês *MutL homolog 1*
MMR = do inglês *Mismatch repair system*
mRNA = RNA mensageiro
MSH2 = do inglês *MutL homolog 2*
MSH6 = do inglês *MutL homolog 6*
MSI = do inglês *Microsatellites instability* (Instabilidade Microssatélites)
MSI-H = do inglês *Microsatellites instability high* (Alta Instabilidade Microssatélite)
MSI-L = do inglês *Microsatellites instability low* (Baixa Instabilidade Microssatélite)
MSS = do inglês *Microsatellites Stable* (Microssatélites estáveis)
mTOR = do inglês *Mechanistic target of rapamycin*
MUTYH = do inglês *mutY DNA glycosylase*
MYC = do inglês *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
NKs = do inglês *Natural Killers*
N-Ras = do inglês *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*
OMS = Organização Mundial de Saúde
OX = Oxaliplatina
P53 = proteína 53
PAF = Polipose Adenomatosa Familiar
PC = Pericitos
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDL-1 = do inglês *Programmed cell death 1* (Morte celular programada 1)
PI3K = do inglês *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinositina 3-quinase)
PMS2 = do inglês *PMS1 homolog 2, mismatch repair system componente*
RAF = do inglês *Proto-oncogene, serine/threonine kinase*
RAS = Proto-oncogene, da família das GTPase. Do inglês *RAt Sarcoma vírus* (vírus do sarcoma de rato)
RNA = do inglês *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)
RNAseq = Sequenciamento de ácido ribonucleico
SCNA = do inglês *Somatic copy number alterations* (Alterações no número de cópias somáticas)
SCNA-high = do inglês *Somatic copy number alterations high* (Alterações no número de cópias somáticas alta)
SCNA-low = do inglês *Somatic copy number alterations* (Alterações no número de cópias somáticas baixa)

STAT3 = do inglês *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*

TCGA = The Cancer Genome Atlas

TGF- β = do inglês *Transforming growth factor beta* (Fator de crescimento transformador beta)

TMAs = *Tissue microarrays*

TNM = Tumor, Linfonodo, Metástase

TP53 = *Tumor proteíne p53* (Proteína Tumoral p53)

TSP-1 = Trombo-espondina-1

VEGF = Fator de crescimento endotelial

VEGF-A = Fator de crescimento endotelial vascular - A

VEGF-C = Fator de crescimento endotelial vascular - C

VEGF-D = Fator de crescimento endotelial vascular - D

VEGFR-3 = Receptor de fator de crescimento endotelial vascular 3

VEGFR-2 = Receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2

VSMCs = do inglês *Vascular smooth muscle cells* (Células musculares lisas vasculares)

WNT = do inglês *Wingless-related integration site* (Site de integração relacionado ao Wingless)

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second most frequent cancer in men and women in Brazil, with an incidence peak around 70 years old and a 5-year survival rate around 50% to 65%. Studies indicate the gene *EGFL7* as important in controlling angiogenesis and cancer growth, including in CCR. However, studies combining chemotherapy and bevacizumab (anti-VEGF) + parsatuzumab (anti-EGFL7) in CRC have not shown promising results. Therefore, the role of EGFL7 in the carcinogenesis should be better investigated to allow the development of more effective treatment protocols. Thus, this project aimed to evaluate the potential prognostic value of EGFL7 in CRC, characterize its expression in cell lines and evaluate which signaling pathways are influenced by the expression of *EGFL7*, providing the basis for future functional studies. EGFL7 protein expression was evaluated through immunohistochemistry in 487 patients diagnosed with CRC, and the labeling pattern was correlated with clinicopathological data. Finally, *in silico* analyzes were performed with CRC data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) by performing differential expression analysis of patients with high and low expression of *EGFL7* in analysis of gene ontology (biological processes) and pathways of KEGG. We found a total of 77.8% of patients with low expression of EGFL7, and this was related to higher lymph node spread ($p = 0.020$), higher invasion of lymphatic vessels ($p = 0.033$) and recurrence ($p = 0.028$). Finally, we found *in silico* that the expression of *EGFL7* may be related to processes associated with carcinogenesis, such as inflammation, cell growth, cell adhesion, angiogenesis, and important pathways such as proteoglycans in cancer, VEGF, Ras, Rap-1, MAPK and PI3K/Akt. Our results show that the expression of EGFL7 may be associated with important pathways mainly related to carcinogenesis and angiogenesis that can alter functions related to tumor invasive processes, leading to higher recurrence.

Keywords: *In silico analysis*, Colorectal cancer, *EGFL7*, Immunohistochemistry.

Resumo

O câncer colorretal (CCR) é o segundo tipo de câncer mais frequente em homens e mulheres no Brasil, com pico de incidência em torno dos 70 anos de idade e sobrevida em 5 anos variando entre 50% e 65%. Estudos apontam o gene *EGFL7* como importante mediador no controle da angiogênese e crescimento de neoplasias, incluindo no CCR. No entanto, estudos combinando quimioterapia e bevacizumabe (anti-VEGF) + parsatuzumabe (anti-EGFL7) em CCR, não mostraram resultados promissores. Portanto, o papel do gene *EGFL7* na carcinogênese deve ser melhor estudado para que sejam propostos protocolos mais eficazes de tratamento. Para melhor compreender o papel do gene *EGFL7* em CCR, este projeto objetivou avaliar o potencial prognóstico de *EGFL7* em CCR e avaliar potenciais vias de sinalização influenciadas pela expressão de *EGFL7* gerando base para futuros estudos funcionais. A expressão proteica foi avaliada através de imunohistoquímica em 487 pacientes diagnosticados com CCR, e o padrão de marcação foi associado a dados clinicopatológicos. Por fim, foram realizadas análises *in silico* com os dados de CCR do The Cancer Genome Atlas (TCGA) através da análise de expressão diferencial dos pacientes com alta e baixa expressão de *EGFL7* e análise de ontologia gênica (processos biológicos) e vias do KEGG. Encontramos o total de 77,8% dos pacientes com baixa expressão de *EGFL7*, e esta estava relacionada com maior comprometimento linfonodal ($p = 0,020$), maior invasão de vasos linfáticos ($p = 0,033$) e recidiva ($p = 0,028$). Por fim, a análise *in silico* revelou que a expressão de *EGFL7* pode estar relacionada com processos carcinogênicos, tais como inflamação, crescimento celular, adesão celular, angiogênese e vias importantes, como proteoglicanos no câncer, VEGF, Ras, Rap-1, MAPK e PI3K/Akt. Nossos dados apontam que a expressão de *EGFL7* está relacionada com vias importantes principalmente relacionadas a carcinogênese e angiogênese e que estas devem alterar substancialmente funções relacionadas aos processos invasivos que conseqüentemente estão relacionados a maior recidiva.

Palavras-chave: Análise *in silico*, Câncer colorretal, *EGFL7*, Imunohistoquímica.

Introdução

Câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que desfrutam de certo grau de autonomia e tendem a aumentar de tamanho, apresentando mecanismos de infiltração, invasão, destruição e penetração do tecido circundante (2, 5). Sua incidência e mortalidade estão crescendo rapidamente em todo o mundo, em parte pelo envelhecimento da população, mas também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco, como sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros (2, 6). Em 2020 houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos (18,1 milhões sem contar os casos de câncer de pele não-melanoma) e 10 milhões de óbitos por câncer no mundo (9,9 milhões excluindo os cânceres de pele não-melanoma) estando entre as quatro principais causas de mortes prematuras (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (6). No Brasil a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil novos casos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não-melanoma). Estima-se que o câncer de pele não-melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (2).

Trata-se de uma desordem causada por alterações no DNA que podem ser herdadas geneticamente, adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões ambientais, e geralmente apresentam alterações epigenéticas. Essas alterações genéticas e epigenéticas alteram a expressão ou função de genes que regulam os processos celulares fundamentais, como proliferação, sobrevivência celular e senescência (5). O acúmulo de alterações dá origem a uma série de propriedades chamadas características fundamentais do câncer (7) **(Figura 1)**. Essas características são:

1. capacidade de sustentar a proliferação crônica, pela qual as células neoplásicas apresentam autossuficiência nos sinais de crescimento através da ativação de oncogenes e supressão de genes supressores tumorais;
2. capacidade de contornar programas poderosos que regulam negativamente a proliferação celular; por exemplo, as ações de genes supressores de tumor como as proteínas RB (retinoblastoma) e p53 (conhecido como “guardião do genoma”);

3. evasão da morte celular, as células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para limitar ou contornar a apoptose, o mais comum é a perda da função supressora tumoral do gene *TP53*, que elimina esse sensor de dano crítico do circuito de indução de apoptose;
4. evasão de mecanismos de senescência celular como a catástrofe mitótica, através de reativação de telômeros, protelando a catástrofe mitótica e alcançando a imortalidade;
5. estímulo da angiogênese para sustentar o crescimento das células neoplásicas, ou acesso à vasculatura já existente;
6. capacidade de invadir tecidos locais e disseminar-se para locais distantes;
7. reprogramação das vias metabólicas — especificamente, alteração para a glicólise aeróbica, mesmo quando há abundante oxigênio;
8. capacidade de escape do sistema imune, no desenvolvimento do câncer o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, rearranjos cromossômicos e síntese anormal de proteínas em células cancerígenas, podem levar ao surgimento de novos antígenos, que podem ser específicos das células cancerígenas ou antígenos associados ao câncer, além disso, os cânceres apresentam vários mecanismos para inibir a resposta imunológica antitumoral, esses mecanismos incluem, supressão de receptores inibitórios, recrutamento de células imunossupressoras, como células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mielóide (MDSC), produção de mediadores imunossupressores por células tumorais e estromais, fibrogênese aumentada, função endotelial aberrante, alterações na apresentação de antígenos tumorais e resistência às vias efetoras imunológicas;
9. instabilidade genômica onde a progressão tumoral, em várias etapas, pode ser retratada como uma sucessão de expansões clonais, cada uma das quais é desencadeada pela aquisição ao acaso de um genótipo mutante habilitador;
10. microbioma polimórfico, onde uma série de microrganismos (vírus, bactérias...) desempenham papel protetivo ou deletérios no desenvolvimento do câncer, progressão maligna e até resposta à terapia;

11. aquisição de plasticidade fenotípica, onde as células malignas adquirem a capacidade de evadir ou escapar do estado de diferenciação celular terminal, o que permite que as células malignas originárias de uma célula normal que alcançou um estado totalmente diferenciado, podem reverter seu curso de volta para estados celulares semelhantes aos progenitores ou em estados celulares progenitoras parcialmente diferenciadas;

12. reprogramação epigenética não mutacional que envolve alterações puramente epigenéticas no desenvolvimento do câncer;

13. a senescência celular por muito tempo tem sido descrita como uma medida protetiva contra o desenvolvimento de câncer, no entanto recentemente estudos tem apontado para células senescentes como potenciais estimuladoras de desenvolvimento de tumores e a progressão maligna;

14. e por fim, todas as lesões neoplásicas contêm células imunológicas presentes em densidades que variam de infiltrações sutis detectáveis apenas com anticorpos específicos do tipo de célula, a inflamações grosseiras que são aparentes mesmo por técnicas de coloração histoquímica padrão. Estas células podem exercer atividade promotora de tumor por produzir fatores de crescimento e infligir dano adicional ao DNA. As alterações genéticas e/ou epigenéticas que dão origem a essas características dos cânceres são sustentadas e permitidas pelo desenvolvimento de instabilidade genômica. Conclui-se, então, que cada lesão neoplásica deve resultar do acúmulo de múltiplas alterações (4, 5, 7).

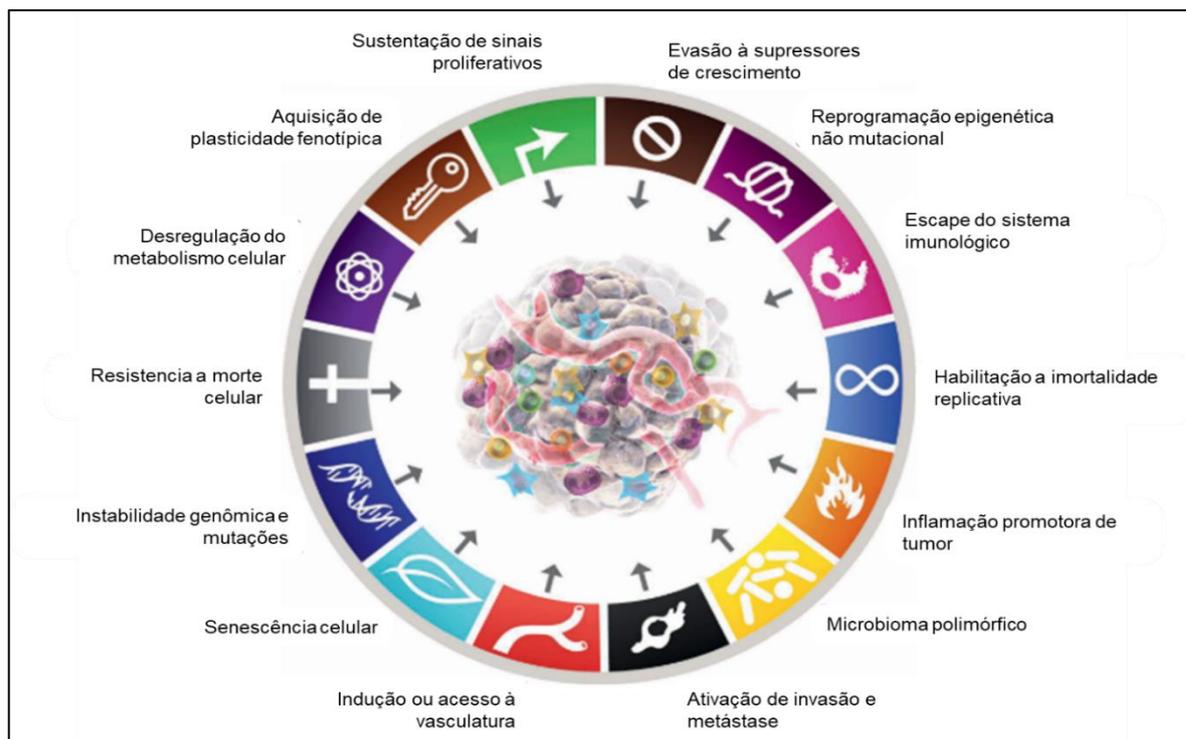


Figura 1: Características fundamentais do câncer. Imagem retirada e adaptada de Hanahan (4)

O Câncer Colorretal (CCR) está entre os quatro tipos de câncer mais letais no mundo, sendo responsável por aproximadamente 10% de todos os diagnósticos e mortes relacionadas ao câncer anualmente (6). Prevê-se que a incidência de CCR em todo o mundo aumente para 2,5 milhões de novos casos em 2035 (3). Em alguns países, como Espanha e muitos outros países do leste Europeu e Asiático, eram considerados há pouco tempo de baixo risco para desenvolvimento desta neoplasia, no entanto nos últimos anos houve um aumento significativo em sua incidência, estudos demonstraram que este aumento ocorreu em grande parte devido a mudanças em padrões de dieta e outros fatores para um chamado “padrão de vida ocidental” (8). Por outro lado, vários países desenvolvidos (como por exemplo os Estados Unidos) vem apresentando uma estabilização ou até diminuição na incidência de CCR, provavelmente pelo aumento da utilização de testes de rastreamento na rotina clínica, como sigmoidoscopia e colonoscopia com polipectomia (9, 10). A sobrevivência dos pacientes diagnosticados com CCR em 5 anos varia de 50% em países em desenvolvimento até 65% em países desenvolvidos (11, 12). No Brasil, o CCR é o segundo mais frequente em homens e mulheres, com 20.520 novos casos em homens e 20.470 em mulheres estimados para 2020 (**Figura 2**) (2). Em estudos epidemiológicos, o sexo masculino e o aumento da idade têm mostrado

consistentemente fortes associações com a incidência da doença (3). Sua incidência é baixa em pacientes abaixo dos 50 anos de idade, mas aumenta consideravelmente a partir desta idade, com a idade média de surgimento em torno de 70 anos de idade em países desenvolvidos (13).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Corpo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2: Incidência de casos para 2020 dos principais tipos de câncer segundo INCA (2).

CCR abriga todas as neoplasias localizadas no intestino grosso e reto, sendo os adenocarcinomas o tipo histológico mais frequente (14). Fatores genéticos e ambientais desempenham um papel importante na etiologia do CCR, sendo a maioria de origem esporádica, embora a história familiar positiva pareça ter uma participação em aproximadamente 10-20% de todos os pacientes com CCR. O risco de desenvolvimento de CCR em indivíduos com histórico familiar é variável, dependendo do número e grau de parentes afetados, bem como a idade do diagnóstico destes tumores, com estimativas de herdabilidade do câncer colorretal variando entre 12% e 35% (1, 3). Além disso, os pacientes com doença inflamatória intestinal crônica e aqueles com história prévia de CCR ou adenomas têm um risco aumentado de desenvolvimento de CCR e requerem vigilância adequada (15) (**Figura 3**).

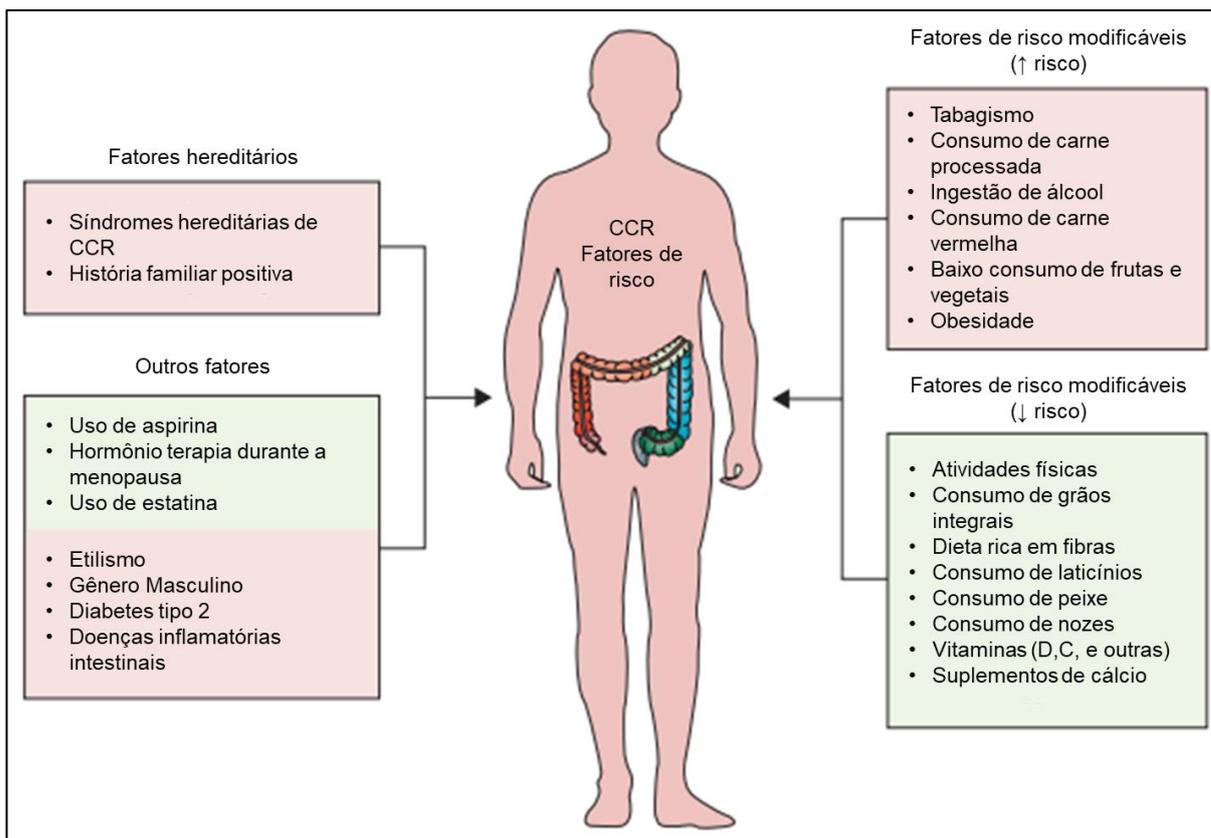


Figura 3: Principais fatores risco para CCR. Imagem retirada e adaptada de Dekker et. al. (3).

A maioria dos fatores hereditários para CCR ainda são pouco descritos e sujeitos a estudos adicionais. Entretanto, um subgrupo de aproximadamente 5 a 7% de pacientes com CCR é afetado por síndromes hereditárias bem definidas (1, 3). As síndromes de câncer colorretal hereditário podem ser subdivididas em não polipose (Síndrome de Lynch) e síndromes de polipose (13). As síndromes de polipose são mais facilmente reconhecidas devido ao número de pólipos e o tipo de pólipos que podem levar diretamente ao diagnóstico apropriado (3). A síndrome polipose mais comum é a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), uma doença autossômica dominante de alta penetrância, definida por numerosos pólipos adenomatosos na mucosa gastrointestinal e um conjunto distinto de lesões extra intestinais envolvendo vários órgãos (16). É causada por mutações hereditárias no gene *APC*, que controla a atividade da via de sinalização WNT (17). A maioria dos pacientes com PAF desenvolve um grande número de adenomas colorretais e subsequente câncer colorretal em idade jovem (1).

A síndrome de Lynch, entretanto, é a mais comum considerando os casos de CCR hereditários, e a mais dificilmente diagnosticada, pois esses pacientes têm

poucos adenomas e a morfologia desses adenomas assemelha-se a lesões esporádicas. Portanto, uma análise molecular sistemática do tecido tumoral em pacientes de qualquer idade ou um subgrupo de pessoas com menos de 70 anos é fortemente recomendada para melhorar o diagnóstico dessa síndrome genética (3). Esta síndrome é causada por alterações hereditárias que acarretam a uma disfunção do sistema de reparo de mau pareamento do DNA (*mismatch repair system* - MMR), essas alterações são principalmente variantes heterozigóticas germinativas nos quatro principais genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) ou epi mutações em *EPCAM*. Essas alterações são caracterizadas pela inserção ou deleção de regiões de microsatélites no tumor em comparação com o tecido saudável, chamada de instabilidade de microsatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*) e encontrada na análise molecular e imunohistoquímica (18, 19). Os pacientes com Síndrome de Lynch desenvolvem CCR em uma idade média de 45 anos em comparação com 67 anos na população em geral, além de estarem mais suscetíveis ao surgimento de outros tipos de tumores, como tumores endometriais (18). Outras síndromes hereditárias de câncer colorretal incluem polipose associada a mutações no gene *mutY DNA glicosilase (MUTYH)*, síndrome de Peutz-Jeghers, polipose serrilhada e polipose juvenil (1).

Entre os fatores ambientais associados ao desenvolvimento de CCR esporádico, estão tabagismo, ingestão de álcool, consumo de carne vermelha e consumo de carne processada (12). Há indícios de que o índice de massa corporal (IMC) alto aumente o risco de CCR entre os homens, enquanto a maior razão cintura-quadril (RCQ) esteja relacionado ao aumento de risco de CCR entre as mulheres (20). Os pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 também apresentam um risco aumentado de CCR (1). Por outro lado, o consumo de leite, grãos inteiros, frutas e vegetais frescos, bem como a ingestão de cálcio, fibra, multivitaminas e vitamina D, diminuem o risco de CCR (1, 3). A atividade física diária por 30 minutos tem magnitude e efeito semelhante. A aspirina em baixas doses também foi associada à diminuição do risco de CCR (1, 15) (**Figura 3**).

Os tumores se desenvolvem a partir de lesões precursoras originárias na mucosa normal, que podem seguir duas vias principais: via tradicional adenoma-carcinoma e via das lesões serrilhadas (**Figura 4**) (3). A via tradicional adenoma-carcinoma é a mais bem caracterizada, sendo responsável por 70-90% dos CCRs. O

mecanismo molecular de desenvolvimento geralmente se inicia com mutações no gene *APC* (21) seguida por mutações no oncogene *KRAS* e inativação do gene supressor tumoral *TP53* (22), muitas vezes acompanhada por instabilidade cromossômica (19, 23). Por outro lado, a via da neoplasia serrilhada está associada a mutações em *KRAS* e *BRAF*, além de instabilidade epigenética, caracterizada pelo fenótipo de metilação da ilha CpG, levando a cânceres microssatélites estáveis e instáveis (3).

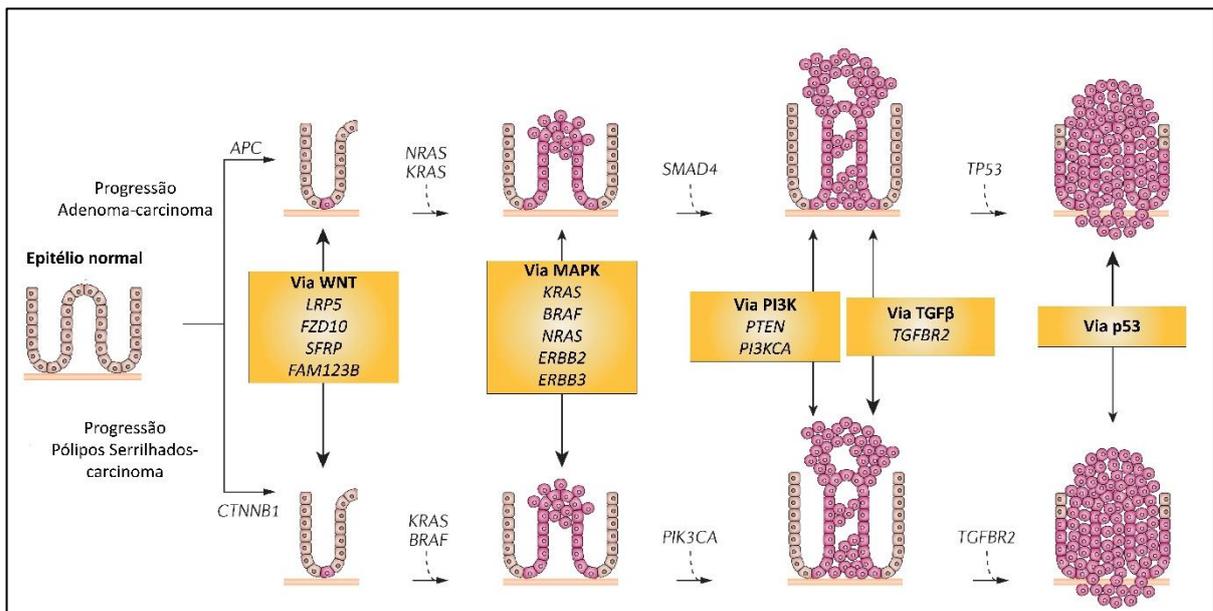


Figura 4: Esquema simplificado do desenvolvimento do CCR. Imagem retirada e adaptada de Kuipers et. al. (1)

Essas características moleculares levam a formação de tumores molecularmente distintos e em alguns casos bem caracterizados, possibilitando a divisão de alguns subtipos de CCR de acordo com suas alterações mais frequentes. Recentemente, um consórcio de subtipos moleculares de câncer colorretal estabeleceu, baseado em dados moleculares, quatro subtipos moleculares de CCR, denominados grupos CMSs (*Consensus Molecular Subtypes*), sendo eles: CMS1, caracterizado por apresentar instabilidade de microssatélite, hipermutação e hipermetilação de regiões ricas em CG, além de frequentemente apresentarem mutações no gene *BRAF*, infiltração e ativação imunológica e pior sobrevida em casos de recidiva; CMS2, caracterizado pela alta frequência de instabilidade cromossômica (CIN) e ativação das vias WNT e MYC; CMS3 que está associado à baixa frequência de instabilidade cromossômica, baixa hipermetilação de regiões ricas em CG, desregulação metabólica e alta frequência de mutações no gene *KRAS*; e por fim,

CMS4 que apresenta alta frequência de instabilidade cromossômica, infiltração estromal, ativação de TGF- β , angiogênese e pior sobrevida global (24) (**Figura 5**).

CMS1 MSI imune	CMS2 Canônico	CMS3 Metabólico	CMS4 Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hipermetilação	SCNA high	Frequência de MSI variável, SCNA low, CIMP low	SCNA high
Mutação em <i>BRAF</i>		Mutação em <i>KRAS</i>	
Infiltração e ativação imunológica	Ativação de WNT e MYC	Desregulação metabólica	Infiltração estromal, ativação de TGF- β , angiogênese
Pior sobrevida após recidiva			Pior sobrevida global e livre de doença

Figura 5: Alterações mais frequentes em cada subtipo de CCR. Imagem retirada e adaptada de Guinney et. al. (24)

Apesar de todas as neoplasias localizadas no intestino grosso e reto serem categorizadas como CCR, há uma grande diferença embrionária, anatômica, biológica e molecular entre as neoplasias localizadas no cólon direito (cólon proximal), cólon esquerdo (cólon distal) e reto (3, 25). A divisão entre o câncer de cólon proximal e distal não é uniforme, porém a definição mais comum é de acordo com a origem embrionária (26). O cólon proximal tem origem embrionária no intestino médio e corresponde ao ceco, cólon ascendente, flexura hepática e cólon transversal até a flexura esplênica (2/3 do intestino grosso), enquanto o cólon distal, que corresponde à flexura esplênica, cólon descendente, sigmoide, retossigmoide (1/3 do intestino grosso), tem origem no intestino posterior, assim como o reto (25, 27). Os tumores localizados na região proximal frequentemente apresentam histologia mucinosa, indiferenciados ou de células de anel de sinete, além de serem mais frequentes em mulheres e estarem associados à idade mais avançada (26, 28). Há diferenças contundentes quando as vias moleculares da oncogênese em tumores que surgem no cólon proximal (26, 29, 30). Os tumores localizados no cólon proximal, surgem frequentemente a partir de lesões serrilhadas (via serrilhada) que apresentam fenótipo de hipermetilação em ilhas CpG (CIMP), que está associado com inativação epigenética dos genes relacionados ao MMR e consequente MSI (25). A via serrilhada está associada a tumores esporádicos e frequentemente apresentam

mutação em *BRAF* (sendo *BRAF V600E* a mutação mais frequente), enquanto tumores relacionados à síndrome de Lynch, os quais também apresentam maior frequência de MSI, estão associadas à via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (25, 26, 28, 29). Os tumores localizados no cólon distal surgem frequentemente a partir de adenomas (via clássica adenoma-carcinoma – 80% dos CCR) e comumente apresentam maior CIN caracterizada por mutações ativantes no oncogene *KRAS* seguida de perda supressores tumorais *APC*, *TP53* (25, 26, 28, 29). Os subtipos de CCR mais frequentes no cólon proximal são CMS1 e CMS3, enquanto que os subtipos mais frequentes no cólon distal são CMS2 e CMS4 (26, 31). Em uma meta-análise recente (29), Petrelli e colaboradores observaram que pacientes com tumores localizados no cólon distal, apresentam melhor sobrevida, independentemente do estágio, raça, quimioterapia adjuvante (29). Porém, quando levado em consideração os casos com alta instabilidade de microssatélite (MSI-positivos) em estágios iniciais (II e III) da doença, os pacientes com tumores localizados no cólon proximal apresentam melhor sobrevida (26, 29). Além de todas as diferenças já citadas, há diferenças distintas quanto a imunologia da mucosa do cólon, que pode ser resultado de diferenças na microbiota entre o cólon proximal e distal (31). Por exemplo, tumores MSI, mais comuns no cólon proximal, apresentam linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) como uma de suas características, além de apresentarem células imunológicas mais ativas, promovendo maior imunogenicidade (25) **(Figura 6)**.

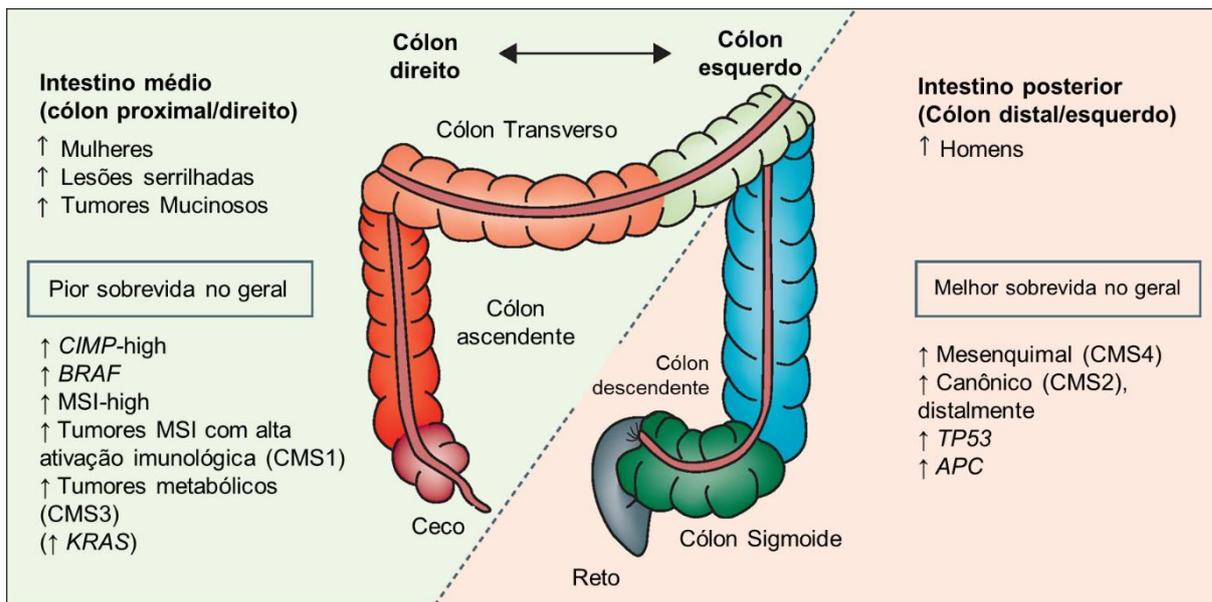


Figura 6: Esquema simplificado com as principais características dos tumores localizados no cólon proximal/direito e distal/esquerdo. Imagem retirada e adaptada de Dekker et. al. (3)

O sistema imunológico desempenha um papel importante no controle do desenvolvimento de cânceres, reconhecendo e destruindo as células neoplásicas, esse conceito é conhecido como “imunovigilância do câncer” (5, 32). O acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, rearranjos cromossômicos e síntese anormal de proteínas em células cancerígenas, podem levar ao surgimento de novos antígenos, que podem ser específicos das células cancerígenas ou antígenos associados ao câncer (2). Porém, o sistema imunológico pode atuar inibindo o desenvolvimento de cânceres, ou ainda em benefício do próprio dependendo da circunstância (33). De modo geral, após a lise de células tumorais por células imunológicas inatas, como células NKs, células NKTs e macrófagos, as células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas, capturam, processam e apresentam antígenos tumorais para linfócitos T CD4+ através da classe de histocompatibilidade II (MHC – II) ou para linfócitos T CD8+ através de MHC – I (34). Em CCR o sistema imunológico pode desempenhar um papel na prevenção da ocorrência, crescimento e metástase (34). A infiltração de células imunológicas inatas como natural killer (NK), natural killer T (NKT) e linfócitos T $\gamma\delta$ foi relatado na literatura como um bom prognóstico em CCR (34, 35). Além disso, pacientes com infiltração aumentada de células imunológicas podem se beneficiar mais da quimioterapia (35). Possivelmente a ativação de células T *helper* Th1 (T CD4+) e de memória citotóxica (T CD8+) desempenham um papel importante na prevenção de recorrência e/ou metástase em CCR (36). Os linfócitos

infiltrantes de tumores (TILs) MSI-H CCR são geralmente enriquecidos por linfócitos com funções antitumorais, entre eles, células CD4+/CD8+ de memória e efetoras, células T $\gamma\delta$, Th1, Th2 Treg, células T auxiliares foliculares, células B imaturas e de memória e células NKT (36). Enquanto CCR com estabilidade de microssatélite (MSS) são caracterizados por níveis mais baixos de memória efetora e células CD4+ e CD8+ de memória (36). Entre os subtipos de CCR, o subtipo CMS1 é descrito na literatura como sendo os mais imunogênicos, sendo rico em células T CD8+, células B e macrófagos, porém pobre em assinaturas de células mieloides e endoteliais e na expressão de genes indutores de angiogênese. Além disso, CMS1 apresenta maiores expressões gênicas PD-1 e HLA classe I, sugerindo um possível mecanismo de evasão do sistema imunológico (36). Portanto há uma forte relação entre as características genéticas, transcricionais, imunológicas e o prognóstico do CCR primário, por exemplo, células T Th1/CD8+ enriquecidas no microambiente tumoral estão associadas a uma menor incidência de recorrência e/ou metástase, enquanto um microambiente tumoral enriquecido em fibroblastos associados ao câncer (CAF) no CCR primário está associado à um pior prognóstico em estágios iniciais (36).

O tratamento padrão do CCR inclui cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (37, 38). Em geral, o tratamento do CCR depende do estágio da doença, características patológicas, estado de instabilidade de microssatélites, alterações genômicas, possíveis efeitos adversos do tratamento, idade do paciente, estado de desempenho, comorbidades e preferência do paciente. Para câncer colorretal localizado, o tratamento geralmente é curativo com ressecção cirúrgica e pode incluir quimioterapia adjuvante. Para câncer colorretal metastático (mCRC), o tratamento é influenciado por vários fatores, incluindo características do tumor primário, número de órgãos envolvidos, estado de instabilidade de microssatélites e resultados de testes genômicos para alterações principalmente em *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e *Her2*. O tratamento sistêmico para mCRC geralmente inclui o uso de quimioterapia com regimes de oxaliplatina (OX), 5-fluorouracil (5FU) e leucovorina (Lv) (FOLFOX) e irinotecano, 5FU e Lv (FOLFIRI), juntamente com terapias biológicas, incluindo antiangiogênicos, como Bevacizumab frequentemente utilizado no tratamento de CCR (39, 40). A escolha do tratamento pode ser apoiada pelo estágio TNM (Tumor, Linfonodo, Metástase), sendo a categoria N (número de linfonodos positivos – LN+) um dos fatores mais importantes, uma vez que os pacientes LN+ são considerados

para quimioterapia adjuvante (41). Para estes, estudos mostram que as características moleculares do tumor devem ser consideradas para a escolha do regime a ser utilizado, como a presença de instabilidade de microssatélites ou mutação no gene *KRAS* (42, 43). Pacientes *wild type* para *KRAS* (*KRAS_{wt}*) seriam mais beneficiados com terapias anti-*EGFR* do que os pacientes com mutação nesse gene (42). Esses dados são importantes uma vez que aproximadamente 50% dos tumores corretais são conhecidos por apresentarem mutação em *KRAS* (44). Além disso, nestes pacientes, existem outros genes que podem estar ativando constitutivamente a via das MAP quinases (MAPK) e/ou contribuindo para outros fatores importantes no desenvolvimento desta neoplasia e suas implicações biológicas, tais como angiogênese e formação de metástases.

Assim como em outras neoplasias, a formação de metástases é um agravante em pacientes com CCR. Por essa razão é importante entender melhor o processo de invasão e metástase que envolve uma série de etapas sequenciais chamadas de cascata de invasão-metástase (5, 7). Essas etapas consistem em 1) invasão local, 2) intravasamento nos vasos sanguíneos e vasos linfáticos, 3) trânsito na vasculatura, 4) saída dos vasos, 5) formação de micrometástases e 6) crescimento de micrometástases em tumores macroscópicos (45). Previsivelmente, essa sequência de etapas pode ser interrompida em qualquer estágio, por fatores relacionados ao hospedeiro ou ao tumor, pois a metástase é um equilíbrio das interações celulares hospedeiro-tumor que podem variar entre os pacientes e os diferentes tipos tumorais (46). A taxa de sobrevivência das células tumorais circulantes é de cerca de 0,2%, e essas células tumorais circulantes são então capazes de metastatizar para órgãos-alvo (45). Além disso, as características do fluxo sanguíneo e a estrutura do sistema vascular também podem regular os padrões de disseminação metastática (46). O resultado da metástase depende de múltiplas interações de células metastáticas com mecanismos homeostáticos, de modo que a terapia de metástases pode ter como alvo não apenas as células cancerosas, mas também os fatores homeostáticos que promovem o crescimento de células tumorais, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase (46).

Aproximadamente 35% dos pacientes com CCR apresentam doença metastática no diagnóstico e até 50% dos pacientes que apresentam câncer colorretal não metastático no diagnóstico, progridem com doença metastática (47). Mais de 70%

das mortes relacionadas ao CCR são causadas por metástases no fígado (48). Avanços recentes na terapia e cuidados multidisciplinares levaram a melhorias significativas na sobrevida de pacientes com CCR, mas a cura não é possível para a maioria dos pacientes com CCR metastático (mCCR), contudo, a presença de certos marcadores moleculares ajuda a orientar o tratamento em mCCR. Como observado, os pacientes com CCR mutante *RAS* e *BRAF* são menos prováveis de se beneficiarem da terapia anti-EGFR (44).

Além de possibilitar a metástase tumoral, os vasos sanguíneos e linfáticos são importantes para o transporte eficiente de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de sinalização e células circulantes entre tecidos e órgãos em circunstâncias normais, ou até mesmo no contexto do câncer, sendo assim importante para a manutenção tumoral (49, 50). Assim angiogênese e linfangiogênese são fatores importante a ser considerado na carcinogênese.

A angiogênese é o processo responsável pelo surgimento de novos vasos sanguíneos a partir de outros preexistentes (51). É importante para a invasão e metástase das células tumorais, pois o crescimento de uma lesão metastática requer que ela desenvolva uma rede vascular, evite a resposta imune do hospedeiro e responda a fatores específicos do órgão que influenciam o crescimento (46). Assim uma lesão metastática é o resultado de uma ou várias células adquirindo a capacidade de contornar uma série de obstáculos moleculares e biofísicos, correspondendo aos processos que envolvem a disseminação das células cancerosas de uma lesão primária para os órgãos distais sendo a principal causa da letalidade do câncer (52).

Em condições normais, durante a embriogênese, a vasculatura se forma a partir de células mesodérmicas que se diferenciam em células precursoras endoteliais (CPEs) e formam agregados, conhecidos como ilhotas sanguíneas. Essas ilhotas levam à formação vasculogênica de plexos capilares primários e após a circulação sanguínea ser estabelecida os plexos primários são remodelados em uma rede de arteríolas, artérias, capilares, vênulas e veias. As células musculares lisas vasculares (vSMCs) estão associadas a artérias e veias, enquanto os capilares são cobertos por pericitos. As primeiras células endoteliais linfáticas (CELs) brotam das veias embrionárias, depois migram e formam sacos linfáticos. Outras etapas do crescimento

linfangiogênico envolvem brotamento, ramificação, proliferação, diferenciação e processos de remodelação (**Figura 7**).

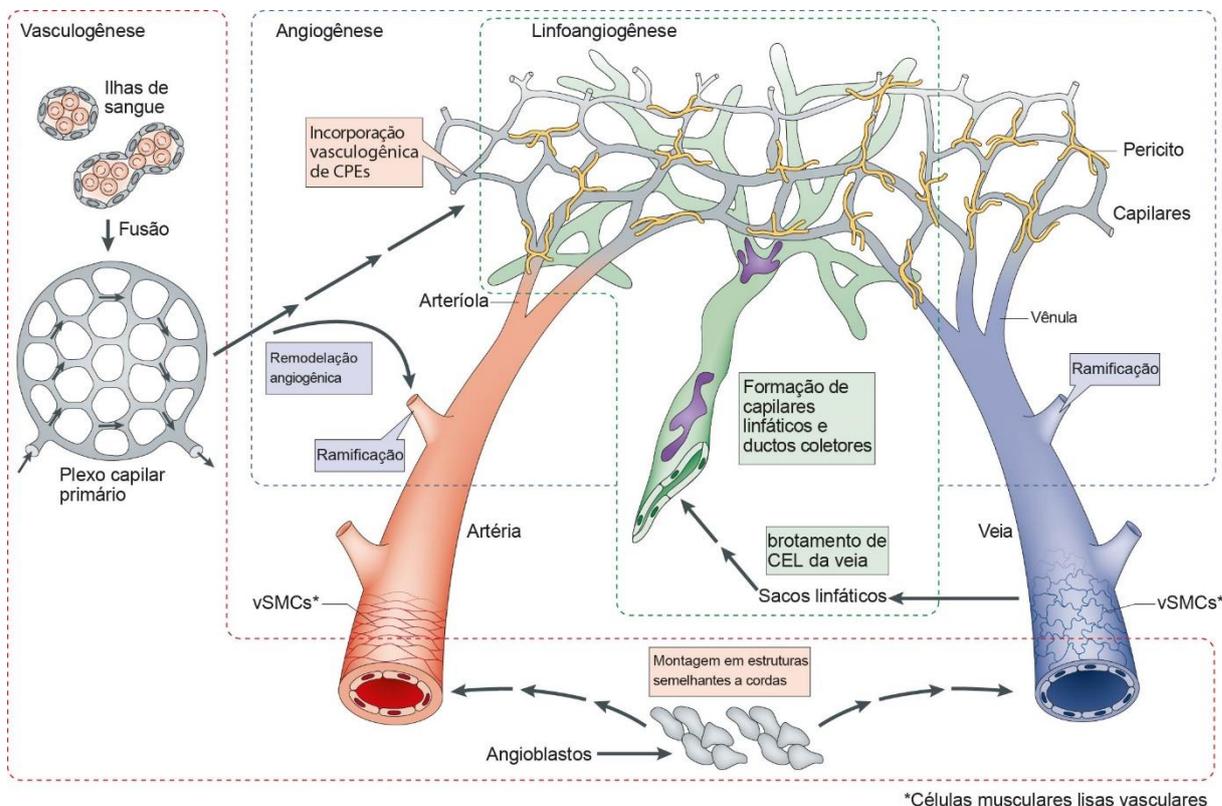


Figura 7: Esquema simplificado da montagem da vasculatura. Imagem retirada e adaptada de Adams et.al. (49)

Existem três tipos de angiogênese: angiogênese germinativa; intussuscepção ou angiogênese dividida, onde uma nova parede cresce dentro de um vaso existente, eventualmente se dividindo em dois vasos; e angiogênese em *loop*, onde as alças dos vasos são mecanicamente arrastadas para o tecido (**Figura 8**) (53). A angiogênese germinativa é a mais comum e o processo de formação de brotos envolve uma série de etapas: (a) Seleção de células de ponta onde uma célula do vaso-mãe torna-se a célula líder migratória e bloqueia suas células vizinhas de adotar um destino de célula de ponta por um processo de inibição lateral; (b) Extensão do broto onde a célula da ponta migra ao longo do caminho quimiotático, seguida por células do caule à direita e (c) formação do lúmen onde ocorre a conexão do espaço luminal do broto com o vaso-mãe. O broto em desenvolvimento se conecta a outros vasos por meio de um processo chamado anastomose (**Figura 9**) (54). Em condições normais, a angiogênese ocorre apenas durante o desenvolvimento embrionário, ciclo reprodutivo feminino e reparo de feridas (51).

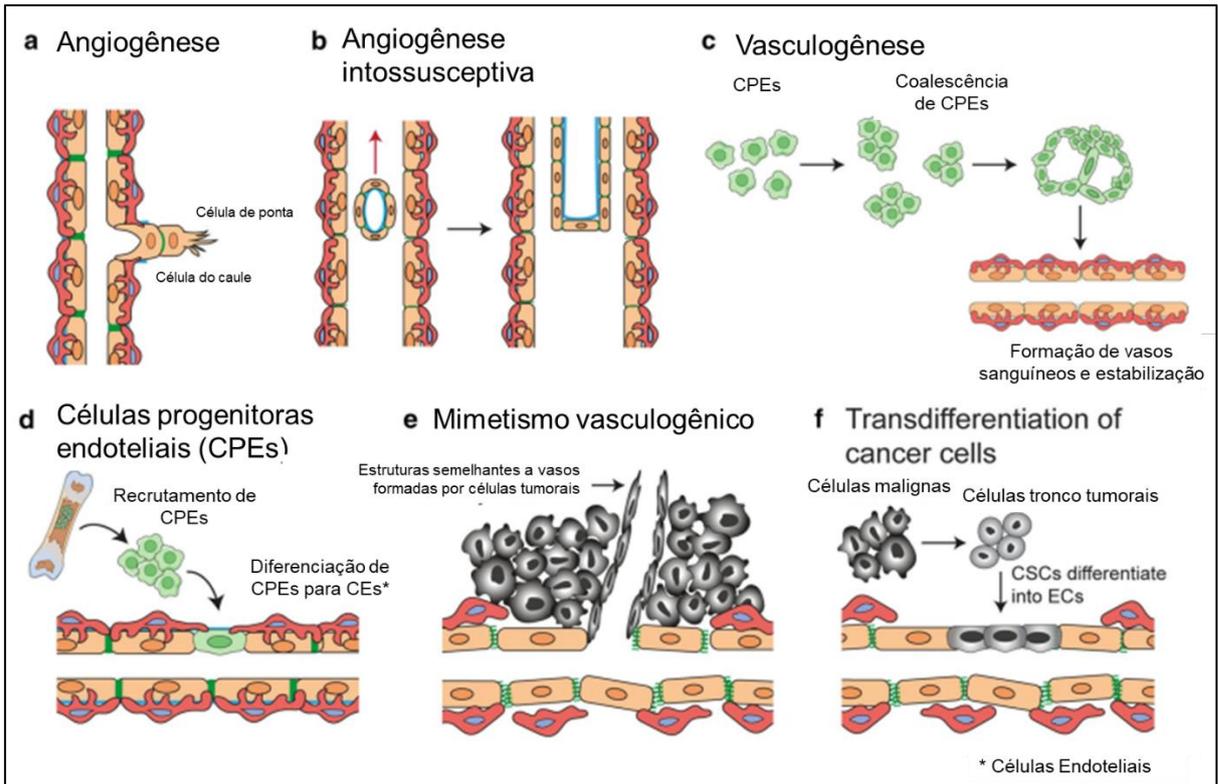


Figura 8: Esquema simplificado do mecanismo de formação de vasos sanguíneos. Imagem retirada e adaptada de Lugano et. al. (54).

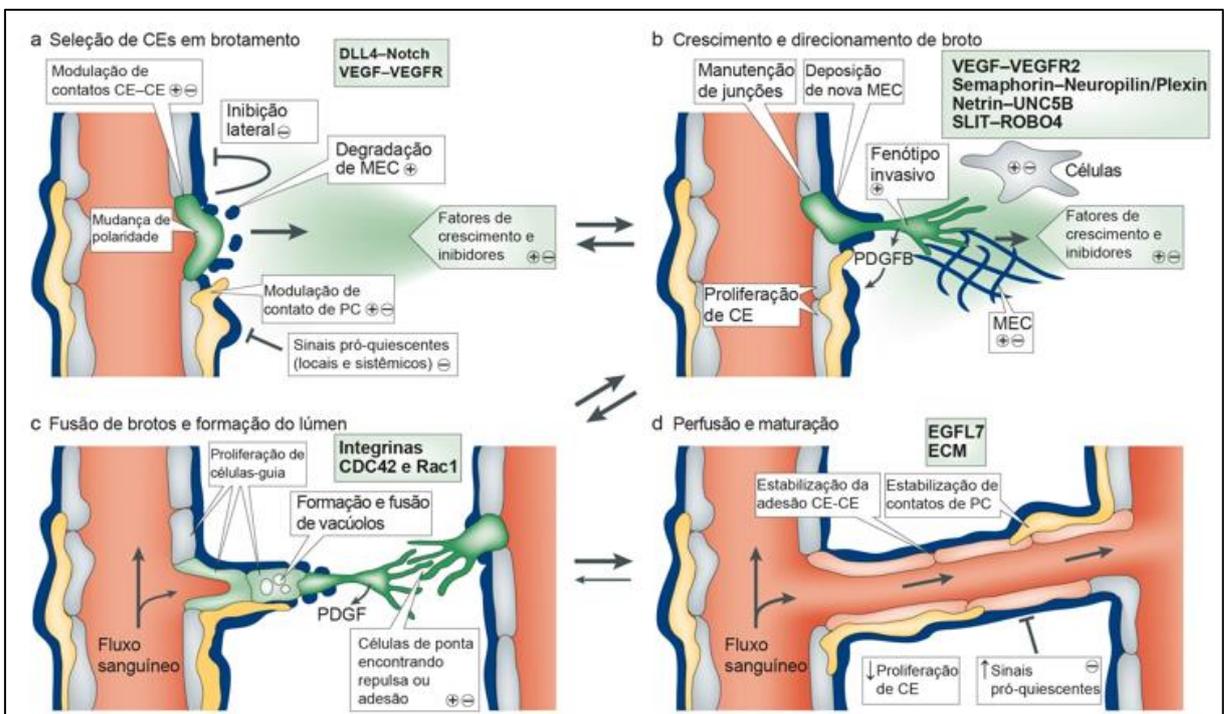


Figura 9: Esquema simplificado das etapas da angiogênese. Imagem retirada e adaptada de Adams et. al. (49)

Durante a progressão tumoral, a angiogênese é quase sempre ativada permanentemente, fazendo com que a vasculatura normalmente quiescente brote

continuamente novos vasos que auxiliam na sustentação do crescimento neoplásico em expansão e, em alguns casos, as células neoplásicas podem estimular a vasculogênese, na qual as células endoteliais são recrutadas da medula óssea (5, 7). No entanto, a vasculatura tumoral é aberrante, a neovasculatura do tumor é marcada por brotamento capilar precoce, ramificação convoluta e excessiva dos vasos, vasos distorcidos e aumentados, fluxo sanguíneo errático, micro hemorragia, vazamento e níveis anormais de proliferação de células endoteliais e apoptose (**Figura 10**) (55). Esses vasos sanguíneos tumorais anormalmente organizados e com vazamento contribuem para a angiogênese tumoral, infiltração de células inflamatórias, metástases e o desenvolvimento de resistência a agentes quimioterápicos em tumores de origem diversa (56).

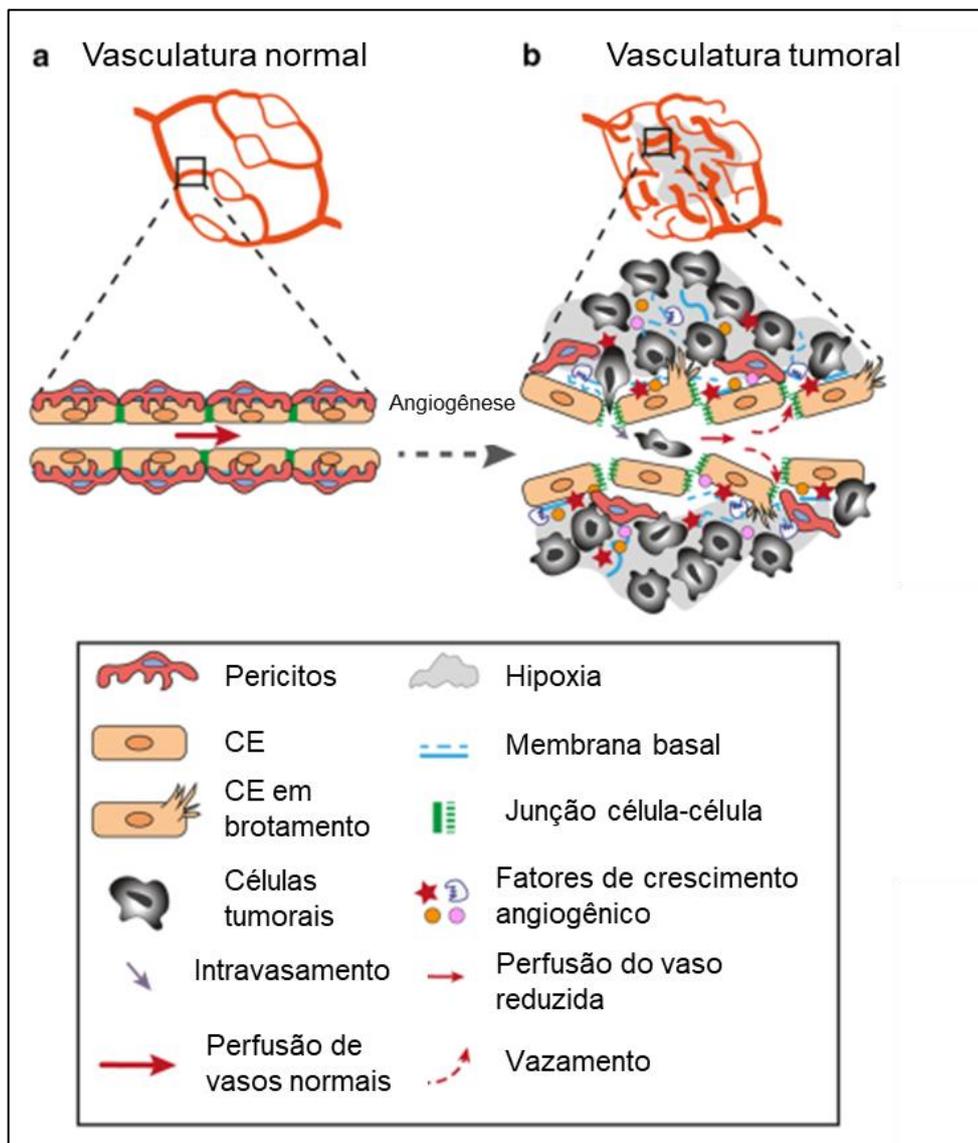


Figura 10: Esquema simplificado da morfologia dos vasos sanguíneos tumorais. Imagem retirada e adaptada de Lugano et. al. (54)

Os fatores envolvidos na angiogênese podem ser categorizados em fatores ambientais como hipóxia ou aumento das quantidades de óxido nítrico produzido pelas células endoteliais, mecânicos e principalmente químicos (53). O processo de angiogênese é governado por fatores indutores ou inibidores, os protótipos mais conhecidos são o fator de crescimento endotelial vascular - A (VEGF-A) e a trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente (7, 57).

Os vasos linfáticos são essenciais para o desempenho de funções imunológicas, servindo como um canal para leucócitos extravasados e células apresentadoras de antígenos ativadas, além de funções como homeostase dos fluidos dos tecidos e absorção de gordura dietética (49, 50, 58). A vasculatura linfática forma uma rede unidirecional de capilares cegos consistindo de uma única camada de endotélio com uma membrana basal descontínua não revestida por pericitos, esses vasos coletam o fluido rico em proteínas que exsuda dos vasos sanguíneos e, em seguida, drenam através de um sistema de ductos de vasos coletores, nódulos linfáticos e troncos linfáticos para a circulação venosa (49, 50, 58).

Semelhante à angiogênese, a linfangiogênese requer uma série de eventos celulares complexos, incluindo proliferação, brotamento, migração e formação de tubo (58). A sobrevivência, proliferação e migração de células endoteliais linfáticas depende do receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2) e da sinalização do receptor de fator de crescimento endotelial vascular 3 (VEGFR3) que é ativado por seu ligante VEGFC ou VEGFD, que pode estimular a ativação dependente da proteína quinase C do ERK1 ou cascata de sinalização ERK2 e das vias PI3K/AKT (50, 58, 59). Além disso, as vias de sinalização que são ativadas em resposta a VEGFC e VEGFD são moduladas pelo co-receptor VEGFR3 neuropilina 2 (NRP2) (58). VEGFR-3 pode formar heterodímeros com VEGFR-2 mediante ligação das formas maduras, proteoliticamente processadas de VEGFC e VEGFD, que podem levar a sinais combinatórios únicos pelos domínios intracelulares dos dois receptores (50). Outra via de sinalização de fator de crescimento importante para a linfangiogênese é a sinalização FGF. Dos quatro FGFRs que se ligam a vários membros da família FGF, o FGFR1 é o receptor de FGF mais proeminente em células endoteliais linfáticas e é necessário para proliferação, migração e formação de tubo de células endoteliais linfáticas induzida por FGF2. Além disso, há indícios de que a supressão da sinalização de FGF devido à deleção de FGFR1 desencadeia a

transição endotelial-mesenquimal (EMT) por meio da ativação da via de fator de crescimento transformador (TGF β) (59). Membros da família do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) também exibem propriedades linfangiogênicas, sendo o PDGF-BB o mais potente (60).

Em pacientes com câncer, os vasos linfáticos, podem ser influenciados por fatores de crescimento derivados do tumor, como VEGFC e VEGFD, levando a linfangiogênese, remodelamento linfático e à modulação da função imunológica, podendo assim, levar a um aumento da disseminação metastática para nódulos linfáticos e potencialmente para órgãos distantes (58). Os eixos VEGFC – VEGFR3 e VEGFD – VEGFR3 são considerados os principais condutores de linfangiogênese. O VEGFC e o VEGFD são frequentemente expressos em tumores humanos primários ou ao estroma associado, podendo ser secretados por células tumorais células imunes e fibroblastos associados a tumores (58).

Em CCR a extensão (estágio) do tumor no momento do diagnóstico, é um fator prognóstico importante, uma vez que o tratamento é determinado a partir desse fator. Um prognóstico consideravelmente ruim é observado em pacientes com cânceres com comprometimento de linfonodos, em comparação com aqueles confinados na parede intestinal (60, 61). Em geral, pacientes com metástases em linfonodos apresentam uma sobrevida reduzida (60, 61).

No CCR, os vasos linfáticos intratumorais são raros e observados apenas em espaços linfáticos estreitos ou colapsados. A maioria dos vasos linfáticos estão localizados em áreas peritumorais próximas às margens de invasão. Estes vasos provavelmente representam vasos pré-existentes comprimidos pela massa tumoral em expansão, que através do processo de surgimento de vasos e dilatação que com o estímulo de VEGF-C, facilita o acesso das células tumorais ao lúmen. Portanto, vasos linfáticos funcionais na margem do tumor, conforme observado no CRC, podem provavelmente ser suficientes para a disseminação do tumor linfangiogênico. Em comparação com tecidos normais, alguns estudos mostraram um aumento na proliferação celular e densidades de vasos linfáticos em CRCs (60). Em modelos animais a superexpressão de VEGFC em tumores aumenta fortemente a formação intra e/ou peritumoral de vasos linfáticos, além de promover metástases em linfonodos e metástases de órgãos e linfonodos regionais para distais (58, 60).

Além dos processos de angiogênese e linfangiogênese, as células cancerígenas podem estimular a vasculogênese (**Figura 8 e Figura 7**), que envolve a formação de novos vasos sanguíneos por células progenitoras endoteliais (CPEs), que podem ser recrutadas da medula óssea ou residirem nas paredes vasculares (5, 7). Há outros mecanismos de recrutamento vascular como, a cooptação, onde as células cancerígenas apresentam a capacidade de cooptar a vasculatura existente. Há também processos onde as células cancerígenas são incorporadas às paredes dos vasos, conhecido como mimetismo vascular (62).

Estudos tem apontado para outros fatores de crescimento críticos para o desenvolvimento angiogênico tumoral, entre eles está o gene *EGFL7* (também conhecido como VE-estatina), um membro da família de fator de crescimento epidermal (EGF)-like, e um regulador importante da patogênese do câncer (63).

EGFL7 é um fator pró-angiogênico, amplamente restrito ao endotélio, que está associado à matriz extracelular (64) e desempenha um papel específico na tubulogênese vascular e regulação da angiogênese (65). Em condições normais, esta proteína é altamente expressa em tecidos bem vascularizados como pulmão, coração, cérebro e retina, possui expressão moderada em tireoide, pâncreas, baço, ureter, bexiga, próstata, testículo, músculo, veia porta e artéria aorta e baixa expressão em tecidos do sistema digestório, como fígado, estômago, duodeno, intestino e cólon (66).

Em humanos, a região do gene *EGFL7* consiste em 11 éxons e um miRNA (miR-126) embutido na região intrônica localizada entre os exons 7 e 8. Este gene localiza-se no cromossomo 9 (9q34.3) e codifica uma proteína, de mesmo nome, de 29,6 kDa (273 aminoácidos) (63, 67). A estrutura molecular da proteína *EGFL7* inclui dois domínios do tipo EGF (68). Um deles compreende uma região semelhante a Delta-Serrate-LAG-2 uma sequência que é conservada em ligantes que se ligam a Notch (67), enquanto o outro pertence a um subdomínio de ligação de cálcio (68) (**Figura 11**).

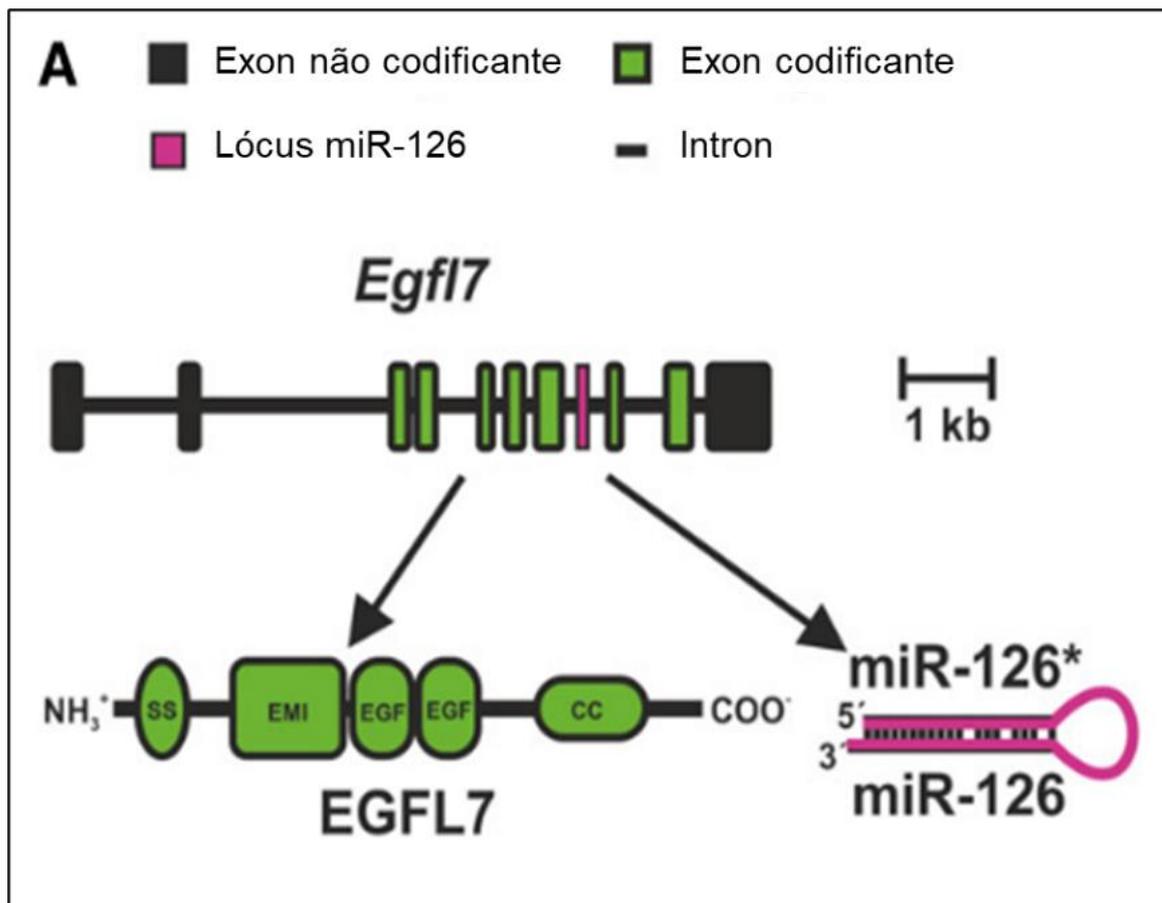


Figura 11: Esquema simplificado da estrutura genica e proteica de EGFL7. Imagem retirada e adaptada de Stanković et. al. (69)

EGFL7 possui um papel vital no controle da angiogênese durante a embriogênese e organogênese (70), mediando algumas vias principais de sinalização, como Notch, integrina e MAPK (63). O desenvolvimento vascular é regulado por várias vias de sinalização, uma delas é a via NOTCH, uma via altamente conservada, responsável por controlar uma diversidade de processos de crescimento e diferenciação que nos vasos sanguíneos em crescimento regula a formação e brotação de células da ponta endotelial na angiogênese (71, 72). O mecanismo de sinalização de NOTCH se dá principalmente pela ligação do ligante NOTCH tipo Delta-like4 (Dll4) que suprime a formação de células endoteliais. Essa ligação pode ser antagonizada por outros ligantes como Jagged 1, que é um fator pró-angiogênico e funciona como uma regulação negativa da sinalização de DLL4-Notch (71, 72). O EGFL7 modula a angiogênese ao interagir com os receptores endoteliais e seu ligante Dll4 levando a inibição da sinalização de NOTCH bloqueando assim a interação de ligante/receptor (63, 67, 73, 74). Outro mecanismo principal de sinalização da angiogênese mediada por EGFL7 é através da interação com integrinas da superfície

celular. Há evidências de que o EGFL7 promove a angiogênese através de ligação com integrinas, principalmente a integrina $\alpha\beta$. EGFL7 medeia as cascatas de sinalização das integrinas levando à ativação da adesão cinase focal (FAK) e subsequentes vias de sinalização a jusante, como MAPK / ERK, PI3K / Akt e Janus quinase (JAK) / STAT3 (63, 75, 76). E por fim, EGFL7 interage diretamente com EGFR ativando assim as vias de sinalização a jusante, como as vias PI3K / Akt e MAPK / ERK, promovendo a desregulação celular. Essa interação desempenha um papel fundamental na angiogênese intratumoral, metástase tumoral e invasão tecidual (63) (Figura 12).

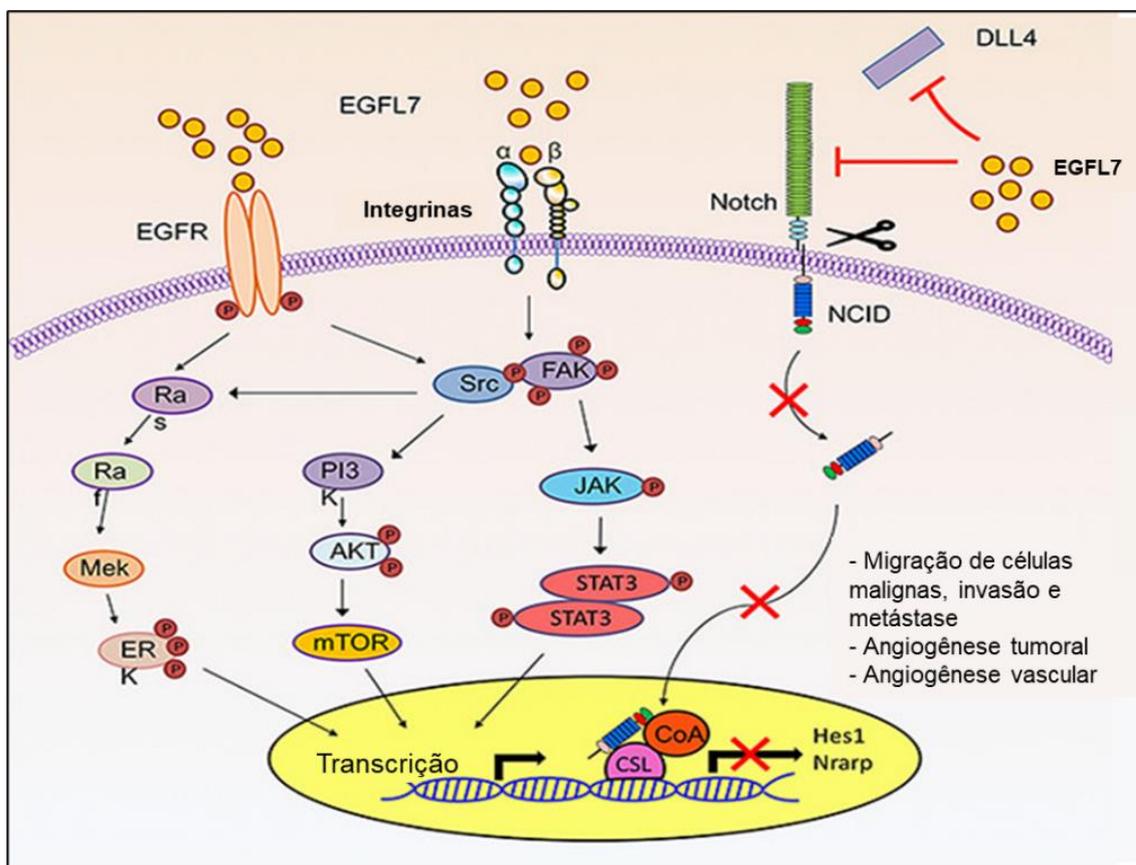


Figura 12: Esquema simplificado das principais vias que regulam a angiogênese através da ação de EGFL7. Imagem retirada e adaptada de Hong et al. (63)

miR-126 é expresso em células endoteliais, incluindo capilares e vasos sanguíneos maiores, e opera sobre diversos transcritos a fim de controlar a angiogênese (77). Em vasos embrionários, miR-126 desempenha um papel pró-angiogênico, no entanto, em vasos maduros este miRNA atua com função oposta, regulando negativamente a angiogênese (78). Há indícios de que miR-126 atue diretamente regulando negativamente a expressão da proteína EGFL7, levando a redução da angiogênese e da migração celular (78). Estudos sugerem que a

expressão de miR-126 pode ser regulada independentemente da proteína EGFL7, o que sugere a existência de um promotor separado que conduz a expressão de miR-126 (77, 78). Além disso, o miR-126 pode ter como alvo outros fatores como, mTOR e VEGF-A, inibindo vias de sinalização importantes facilitando a supressão do câncer colorretal (78, 79). Em CCR, o miR-126 tem sido descrito como um possível supressor tumoral e sua baixa expressão está relacionada ao crescimento tumoral, proliferação de células cancerígenas, metástase e pode estar associado até a resistência às drogas quimioterápicas (77, 79-81).

Estudos mostram a alta expressão de EGFL7 relacionada a eventos de pior prognóstico em diferentes tipos tumorais, como laringe (82), ovário (83), gliomas (84-86), gástrico (87) e CCR (66). EGFL7/EGFR está diretamente relacionado ao desenvolvimento e crescimento de vários tipos tumorais, quando desregulados patologicamente, como gliomas (88), câncer gástrico (89), câncer hepatocelular (90) e câncer renal (91) entre outros.

Sabendo que a angiogênese é um fator importante para o desenvolvimento tumoral e metástase, terapias a base de antiangiogênicos tem sido alvo de estudos recentes. Um dos agentes antiangiogênicos amplamente utilizado para tratamento de tumores sólidos é o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal que bloqueia a atividade do VEGF (anti-VEGF) (40, 92). O bevacizumabe foi o primeiro anticorpo aprovado para mCCR apresentando resultados promissores aos pacientes com esse tipo tumoral (3). Posteriormente, a adição de bevacizumabe a outras bases da quimioterapia demonstrou melhor sobrevida livre de progressão, mas não necessariamente sobrevida global (3). A utilização de bevacizumabe combinado a quimioterapia em pacientes com CCR, apresentaram resultados promissores onde observaram uma diminuição de EGFL7 circulante, além da inibição de VEGF-A, nesses pacientes (40, 93). Em 2013, um grupo de pesquisa propôs a utilização de um agente anti-EGFL7, o parsatuzumabe, para tratamento de tumores sólidos, a fim de fornecer uma alternativa para pacientes com câncer (92). No entanto, estudos realizados com esse agente antiangiogênico em pacientes com CCR e câncer de pulmão não-pequenas células não apresentaram resultados favoráveis ou significantes (94, 95) (**Figura 13**).

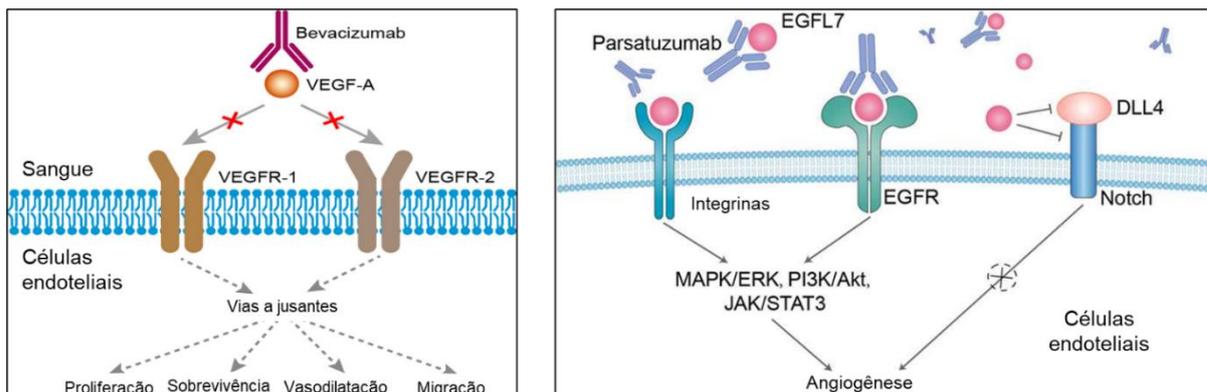


Figura 13: Esquema simplificado da ação das drogas Bevacizumabe e Parsatuzumabe nas células endoteliais. **Fonte:** Imagens retiradas e adaptadas de: <https://www.creativebiolabs.net/bevacizumab-overview.htm> (acesso: 15/03/2022) e <https://www.creativebiolabs.net/parsatuzumab-overview.htm> (acesso: 15/03/2022)

Portanto, com base nas evidências que relacionam a alta expressão de EGFL7 a eventos de pior prognóstico em vários tipos tumorais e no fato de que os estudos utilizando parsatuzumabe, uma droga específica para o bloqueio ou inibição dessa proteína, não obtiveram resultados promissores, a contribuição de EGFL7 na gênese do CCR, bem como o mecanismo de ação que leva a maior angiogênese e metastização deve ser melhor estudados, para que sejam propostos protocolos mais eficazes de tratamento.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial prognóstico da proteína EGFL7 em uma série de câncer colorretal e avaliar *in silico* possíveis vias de sinalização e processos biológicos alterados. Especificamente, os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar através de imunohistoquímica a expressão de EGFL7 em uma casuística bem caracterizada de câncer colorretal humano e associar com características clinicopatológicas e moleculares;
- Avaliar *in silico* a expressão de EGFL7 em uma grande série de câncer colorretal da base de dados do TCGA (The Cancer Genome Atlas) e associar a sobrevivência;
- Relacionar *in silico* a expressão de EGFL7 e de outros genes importantes na gênese do câncer colorretal, bem como realizar a análise de genes diferencialmente expressos em pacientes com alta expressão de EGFL7 vs. expressão normal e baixa expressão vs. expressão normal, analisando processos biológicos e vias de sinalização relacionadas a este gene.

Materiais e Métodos

Fluxograma:

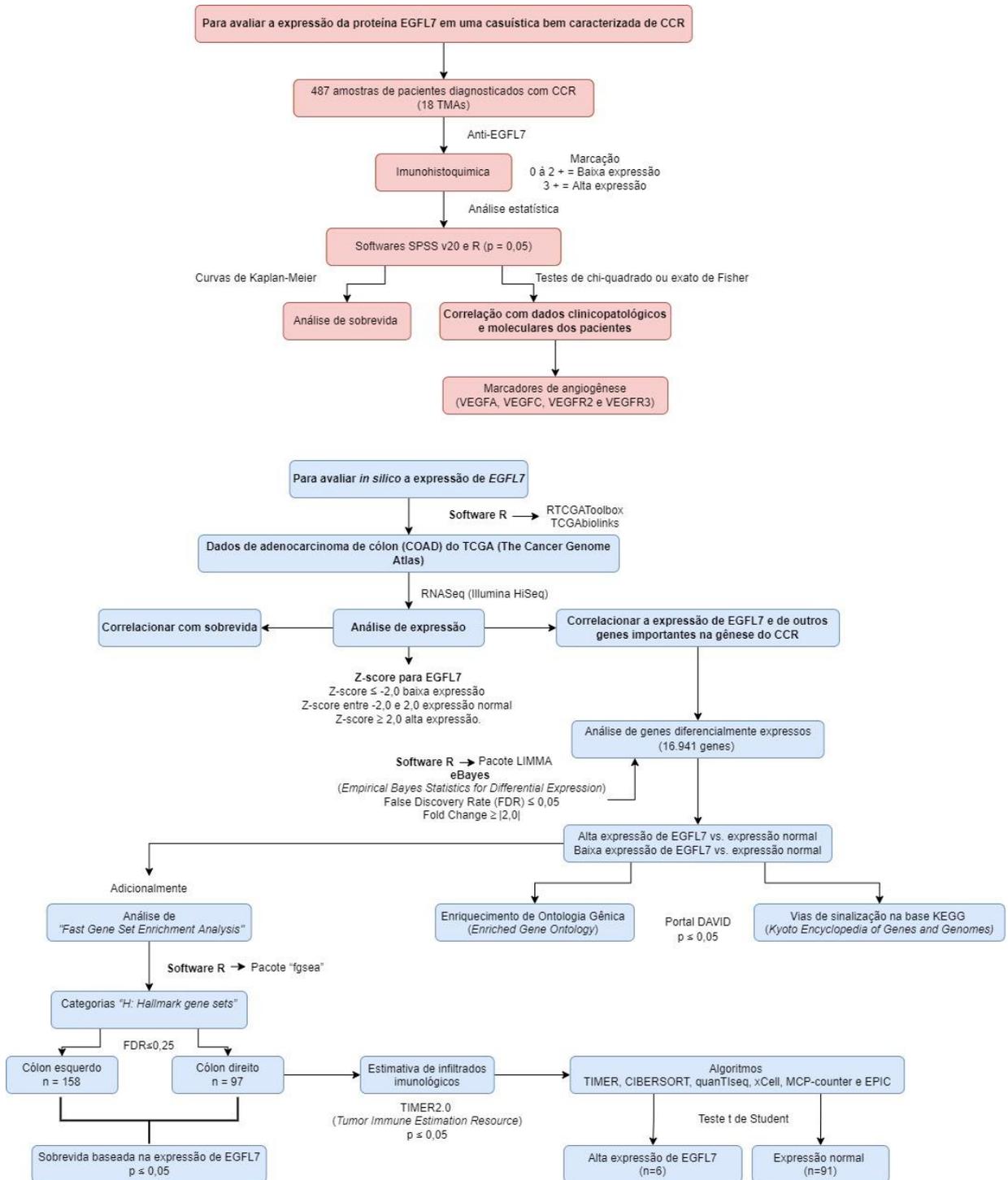


Figura 14: Fluxograma dos materiais e métodos realizados nesse estudo.

Amostragem

Foram avaliados 487 pacientes com o diagnóstico de CCR atendidos no Hospital de Braga, Portugal, entre 1 de janeiro de 2005 e 1 de janeiro de 2010 por meio de *tissue microarrays* (TMAs) (96, 97). (96, 97) Blocos de parafina dos tumores primários de pacientes com o diagnóstico de CCR foram recuperados do Departamento de Patologia do Hospital de Braga de Portugal. Um patologista experiente do Hospital de Braga realizou a revisão histológica, de acordo com os critérios descritos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (13). Em seguida, áreas representativas foram delimitadas, e as amostras foram colocadas em blocos de parafina recipientes utilizando um arrayer com spots de 0,06 mm (Beecher Instruments, Silver, Spring, MD). Secções de 4 µm foram feitas dos arrays e, no intuito de representar diferentes padrões eventualmente encontrados dentro da mesma amostra, foram feitas de 2 à 3 amostragens para o mesmo paciente, sendo amostras tumorais e amostras normais de tecido adjacente. Cortes de rim normais foram utilizados como controles internos, uma vez que o tecido renal é bem vascularizado, além disso o próprio endotélio tumoral foi utilizado como controle. Como os spots do TMA eram de pequeno tamanho, o endotélio foi utilizado apenas como controle interno da reação de imunohistoquímica; portanto, não foi possível realizar qualquer análise mais aprofundada.

Trata-se de uma série muito bem documentada e caracterizada, as mesmas já analisadas no projeto intitulado “Expressão de Marcadores de Metabolismo e de Angiolinfangiogenese no Cancro Colorectal – associação com características clinicopatológicas e impacto no prognóstico”, dados já publicados em Martins et al. 2016 - doi 10.1186/s12885-016-2566-9 “Significance of glycolytic metabolism-related protein expression in colorectal cancer, lymph node and hepatic metastasis”. No entanto, o presente estudo utilizou apenas as 487 amostras de tumores primários dos pacientes, não analisando as amostras de linfonodos e metástases hepáticas, que poderão ser usadas em estudos futuros.

Imunohistoquímica

A reação de imunohistoquímica para EGFL7 foi realizada de acordo com a padronização do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos, utilizando o anticorpo primário anti-EGFL7 (ab115786 – Abcam, Cambridge, MA, USA) (**Figura 15**).

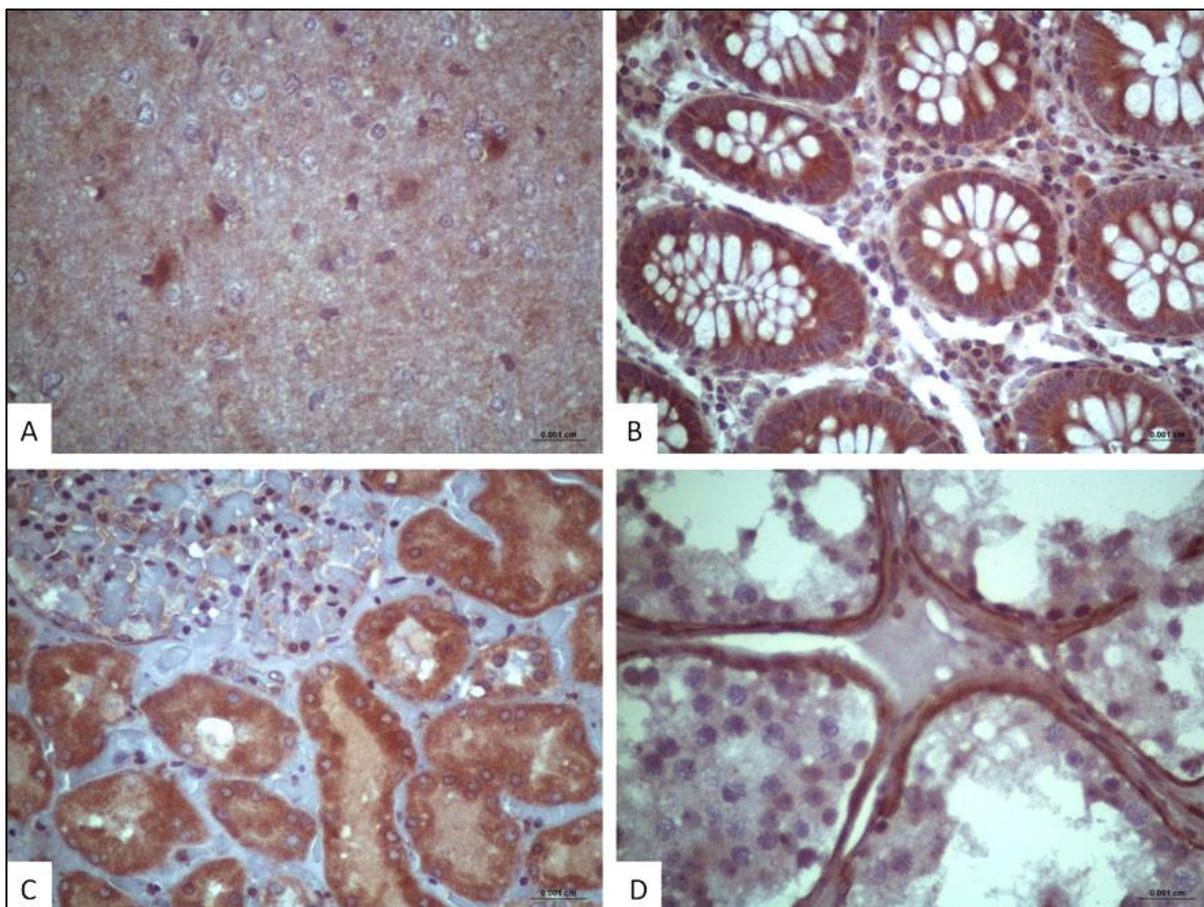


Figura 15. Reação de imunohistoquímica para a proteína EGFL7 em tissue microarray de tecidos normais (20x). A) parênquima cerebral; B) cólon; C) rim; D) túbulos seminíferos

Lâminas com secções de 4 μ m foram desparafinizadas em estufa a 80°C, seguidamente por banhos de xilol e subsequente hidratação. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão tris-EDTA pH 9,0 por 20 minutos a 98°C (banho-maria), seguido de 20 minutos em temperatura ambiente para arrefecimento. Após lavagens com TBS (2 lavagens de 5 minutos entre cada etapa da reação de IHC), foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas e bloqueio de proteínas inespecíficas com o kit de imunohistoquímica Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems, UK). O anticorpo anti-EGFL7 (ab115786 – Abcam, Cambridge, MA, USA) foi aplicado na diluição 1:100 sobre a lâmina, onde ficaram em câmara

úmida por 90 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram aplicados sobre a lâmina anticorpo pós primário (30 minutos), polímero que reconhece o anticorpo secundário e amplifica o sinal (30 minutos), com lavagens com TBS entre cada etapa. Foi realizada a coloração com DAB por 5 minutos. Por fim, a lâmina foi contra corada com hematoxilina, desidratada, montada e armazenada em caixa escura.

Todas as reações foram avaliadas cegamente por 2 pesquisadores e a intensidade da imunorreação para EGFL7 nas células tumorais foi classificada por meio de cruzes (0 a 3 cruzes), onde as amostras que apresentavam coloração negativa eram classificadas como 0, as amostras que apresentavam marcação positiva, porém com intensidade fraca foram classificadas com 1 cruz, as amostras com marcação positiva com intensidade média foram classificadas com 2 cruzes e por fim, amostras com intensidade forte eram classificadas com 3 cruzes. Em geral, toda a extensão tumoral das amostras positivas apresentou imunorreação, por essa razão a classificação foi realizada apenas quanto a intensidade da imunorreação. Posteriormente, os pacientes que apresentaram entre 0 e 2 cruzes foram classificados como “baixa expressão”, enquanto aqueles com 3 cruzes foram classificados como “alta expressão”. A classificação de marcação das amostras foi relacionada com dados clínico patológicos (idade, gênero, história clínica e pessoal de CCR, apresentação clínica, tempo de sintomas, localização, CEA, presença de metástase, tamanho tumoral, tipo histológico, diferenciação, invasão de linfonodos, invasão vascular e linfática, estadiamento clínico e recidiva, seguimento e *status*) dos pacientes e moleculares (marcação imunohistoquímica para VEGFA, VEGFC, VEGFR2 e VEGFR3 – dados prévios do grupo de pesquisa, retirados de (97)).

Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS v20 e R, com significância estatística quando $P < 0,05$. A sobrevida dos pacientes foi analisada independentemente da localização tumoral e separando por localização (côlon direito, côlon esquerdo e reto). Foram realizadas curvas de Kaplan Meier, considerando diferença estatística quando log rank e valor de p menor ou igual a 0,05.

Foi realizada, então, a associação entre os dados de imunohistoquímica para EGFL7 com marcadores de angiogênese (VEGFA, VEGFC, VEGFR2 e VEGFR3) (97)

Análises *in silico*

As análises *in silico* foram realizadas no software R, utilizando os pacotes RTCGAToolbox (98) e TCGAbiolinks (99) para obtenção dos dados de adenocarcinoma de cólon (COAD) do The Cancer Genome Atlas (TCGA) (100). Para as análises de expressão, foram obtidos dados de RNASeq (Illumina HiSeq) normalizados de COAD (n = 298). Foi calculado o Z-score para *EGFL7* para cada paciente. Aqueles que apresentaram Z-score $\leq -2,0$ foram considerados com baixa expressão de *EGFL7*, aqueles com o valor entre -2,0 e 2,0 foram considerados com expressão normal e aqueles com Z-score $\geq 2,0$ foram considerados com alta expressão.

Foi realizada a análise de genes diferencialmente expressos considerando como contraste os grupos de pacientes com alta expressão de *EGFL7* vs. expressão normal ou baixa expressão de *EGFL7* vs. expressão normal utilizando o pacote LIMMA (101): primeiramente, os dados de expressão de todos os genes sequenciados (20.501 genes) foram obtidos em adenocarcinoma de cólon. Em seguida, os pacientes com amostras duplicadas e os genes com número muito baixo de *reads* foram retirados das análises, obtendo-se o total de 16.941 genes e 271 pacientes. Em seguida, foi utilizado o teste eBayes (*Empirical Bayes Statistics for Differential Expression*), implementado o pacote LIMMA em R. Os genes com valor de False Discovery Rate (FDR) $\leq 0,05$ e *Fold Change* $\geq |2,0|$ foram considerados diferencialmente expressos para cada uma das análises. Em seguida, as listas de genes foram submetidas para análise de Enriquecimento de Ontologia Gênica (*Enriched Gene Ontology* - GO) de processos biológicos e de vias de sinalização na base KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) no portal DAVID (102) e os termos foram considerados estatisticamente significantes quando $P \leq 0,05$. Para redução do número de termos do GO, foi utilizada a ferramenta REVIGO (103), que agrupa os termos por semelhança semântica e processo biológico.

Adicionalmente, foi realizada a análise de Fast Gene Set Enrichment Analysis utilizando o pacote “fgsea” em R (104). Os genes diferencialmente expressos foram

analisados na categoria “*H: Hallmark gene sets*”, considerando como estatisticamente significantes as assinaturas com $FDR \leq 0,25$.

Os pacientes foram então distribuídos de acordo com o local de acometimento do tumor (direito – que corresponde ao ceco, cólon ascendente, flexura hepática e transversa e esquerdo – que corresponde à flexura esplênica, cólon descendente, sigmoide e junção reto-sigmoide). Foi realizada a análise de sobrevivência destes pacientes baseada na expressão de EGFL7, considerando $P \leq 0,05$ como estatisticamente significativa em análise de log rank.

A estimativa de infiltrados imunes nos pacientes com adenocarcinoma de cólon acometendo o lado direito ($n=97$) foi realizada utilizando TIMER2.0 (Tumor Immune Estimation Resource (<http://timer.cistrome.org>) (105-107). Foram realizadas estimativas pelos algoritmos TIMER, CIBERSORT, quanTIseq, xCell, MCP-counter e EPIC nos pacientes com alta expressão de EGFL7 ($n=6$) e expressão normal ($n=91$). Para cada estimativa, os grupos “alta expressão” e “expressão normal” foram comparados e foi realizado teste t de Student. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $P \leq 0,05$.

Resultados

Análise de imunohistoquímica

Foram analisadas por meio de imunohistoquímica amostras de 487 pacientes com o diagnóstico de CCR atendidos no Hospital de Braga, Portugal. As amostras foram coletadas e montadas em *tissue microarrays* (TMAs), armazenadas e enviadas para o nosso grupo de pesquisa. Devido à vasta utilização do bloco de parafina e à própria técnica de imunohistoquímica, foram perdidas amostras de 24 pacientes, reduzindo a amostragem para um total de 463 pacientes. Do total, encontramos 360 (77,8%) pacientes com baixa expressão de EGFL7 e 103 (22,2%) com alta expressão. A marcação foi essencialmente citoplasmática (**Figura 16**).

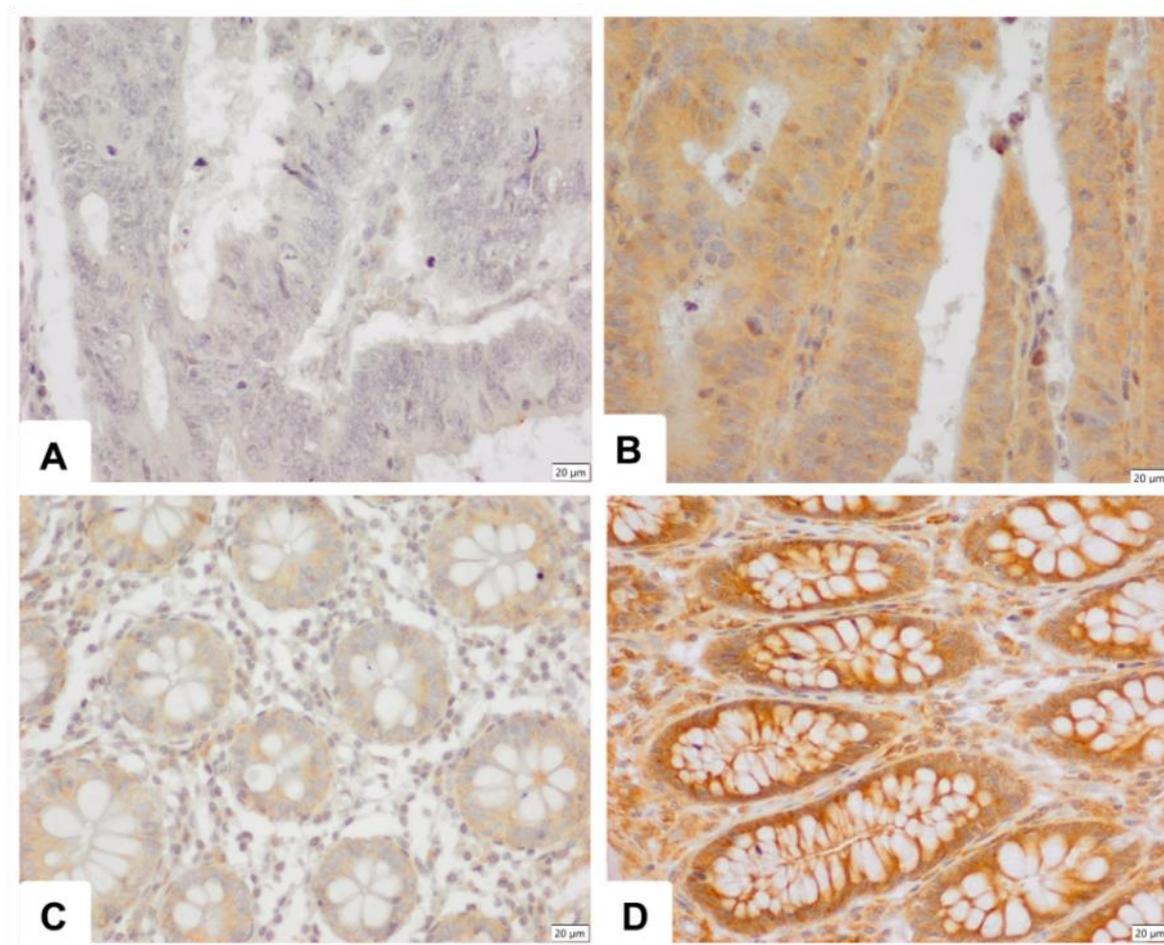


Figura 16: Reação de Imunohistoquímica para a proteína EGFL7 em tissue microarray dos 487 pacientes (400x): A) Tecido tumoral de cólon com baixa expressão; B) Tecido tumoral de cólon com alta expressão; C) Tecido normal do cólon com baixa expressão; D) Tecido normal do cólon com alta expressão.

Não foram encontradas associações entre a expressão de EGFL7 e os dados clínicos dos pacientes (**Tabela 1**).

Tabela 1: Associação entre os principais dados clínicos dos 463 pacientes diagnosticados com CCR e a análise da marcação imunohistoquímica para expressão de EGFL7.

Dados clínicos		Marcação		Valor de p
		Baixa expressão n (%)	Alta expressão n (%)	
		360 (77,8%)	103 (22,2%)	
Gênero	Masculino	227 (78,5%)	62 (21,5%)	0,597
	Feminino	133 (76,4%)	41 (23,6%)	
Idade	<=45	16 (72,7%)	6 (27,3%)	0,36
	>45	344 (78,0%)	97 (22,0%)	
História pessoal de CCR	Sem	348 (77,3%)	102 (22,7%)	0,175
	Com	12 (92,3%)	1 (7,7%)	
História familiar	Sem	301 (78,0%)	85 (22,0%)	0,134
	Com	27 (67,5%)	13 (32,5%)	
Apresentação	Assintomático	65 (78,3%)	18 (21,7%)	0,892
	Sintomático	295 (77,6%)	85 (22,4%)	
Tempo de sintomas	< 6 meses	246 (77,8%)	70 (22,2%)	0,822
	> 6 meses	49 (76,6%)	15 (23,4%)	
Localização	Cólon direito	90 (81,8%)	20 (18,2%)	0,502
	Cólon esquerdo	176 (76,5%)	54 (23,5%)	
	Reto	94 (76,4%)	29 (23,6%)	
CEA	<= 10 ng/mL	243 (76,2%)	76 (23,8%)	0,207
	> 10 ng/mL	59 (83,1%)	12 (16,9%)	

A análise dos dados patológicos dos pacientes ressalta a baixa expressão de EGFL7 em células tumorais associada com maior comprometimento linfonodal (83% dos pacientes com comprometimento linfonodal apresentaram baixa expressão enquanto apenas 73,7% não tiveram comprometimento dos linfonodos, $P=0,020$), invasão de vasos linfáticos (82,1% dos pacientes com invasão de vasos linfáticos apresentaram baixa expressão enquanto apenas 73,6% não tiveram espalhamento linfonodal, $P=0,033$) e recidiva (88,1% dos pacientes com recidiva apresentaram baixa expressão de EGFL7 enquanto apenas 76% não apresentaram recidiva, $P=0,028$) (Tabela 2).

Tabela 2: Associação entre os principais dados patológicos dos 463 pacientes diagnosticados com CCR e a análise da marcação Imunohistoquímica para expressão de EGFL7.

Dados patológicos	Marcação		Valor de p	
	Baixa expressão	Alta expressão		
	n (%)	n (%)		
		360 (77,8%)	103 (22,2%)	
Tipo macroscópico de câncer	Polipoide	181 (76,7%)	55 (23,3%)	0,714
	Ulcerado	84 (77,1%)	25 (22,9%)	
	Infiltrativo	33 (84,6%)	6 (15,4%)	
	Exofítico	29 (78,4%)	8 (21,6%)	
	Viloso	1 (50,0%)	1 (50,0%)	
Diagnóstico de metástase	Não	286 (77,5%)	83 (22,5%)	0,800
	Sim	74 (78,7%)	20 (21,3%)	
Tamanho do tumor	<= 4.5 cm	207 (76,7%)	63 (23,3%)	0,398
	> 4.5 cm	133 (80,1%)	33 (19,9%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	320 (77,1%)	95 (22,9%)	0,061
	Adenocarcinoma mucinoso	39 (86,7%)	6 (13,3%)	
	Anel de sinete e mucinoso	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Diferenciação	Bem	151 (75,1%)	50 (24,9%)	0,398
	Moderadamente	157 (78,5%)	43 (21,5%)	
	Pouco	38 (86,4%)	6 (13,6%)	
	Indiferenciado	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Comprometimento dos linfonodos	Sem	193 (73,7%)	69 (26,3%)	0,020
	Com	156 (83,0%)	32 (17,0%)	
Invasão de vasos venosos	Sem	197 (79,1%)	52 (20,9%)	0,579
	Com	150 (76,9%)	45 (23,1%)	
Invasão de vasos linfáticos	Sem	142 (73,6%)	51 (26,4%)	0,033
	Com	197 (82,1%)	43 (17,9%)	
Estágio	1	55 (70,5%)	23 (29,5%)	0,218
	2	134 (77,0%)	40 (23,0%)	
	3	116 (79,5%)	30 (20,5%)	
	4	55 (84,6%)	10 (15,4%)	

Continua.

Continuação Tabela 2.

Dados patológicos		Marcação		Valor de p
		Baixa expressão	Alta expressão	
Recidiva	Sem	301 (76,0%)	95 (24,0%)	0,028
	Com	59 (88,1%)	8 (11,9%)	

Não encontramos associação entre a expressão de EGFL7 e VEGFA, VEGFC e VGFR3. No entanto, encontramos maior porcentagem de tumores com baixa expressão de EGFL7 com alta expressão de VEGFR2 (78,2% vs. 53,8% com baixa expressão, $P < 0,05$, **Tabela 3**).

Tabela 3: Associação entre expressão de EGFL7 e marcadores de angiogênese.

Marcadores moleculares*		Expressão de EGFL7		Valor de p
		Baixa expressão	Alta expressão	
Expressão de VEGFA	Negativo	8 (88,9%)	1 (11,1%)	0,691
	Positivo	346 (77,4%)	101 (22,6%)	
Expressão de VEGFC	Negativo	31 (86,1%)	5 (13,9%)	0,210
	Positivo	326 (77,1%)	97 (22,9%)	
Expressão de VEGFR2	Negativo	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,049
	Positivo	344 (78,2%)	96 (21,8%)	
Expressão de VEGFR3	Negativo	271 (79,0%)	72 (21,0%)	0,219
	Positivo	83 (73,5%)	30 (26,5%)	

*Dados retirados de (97)

Não foram encontradas diferenças significativas na sobrevida global e livre da doença considerando a expressão global nos pacientes com CCR (em geral) ou com a localização do tumor (cólon direito, cólon esquerdo e reto) (**Figura 17**).

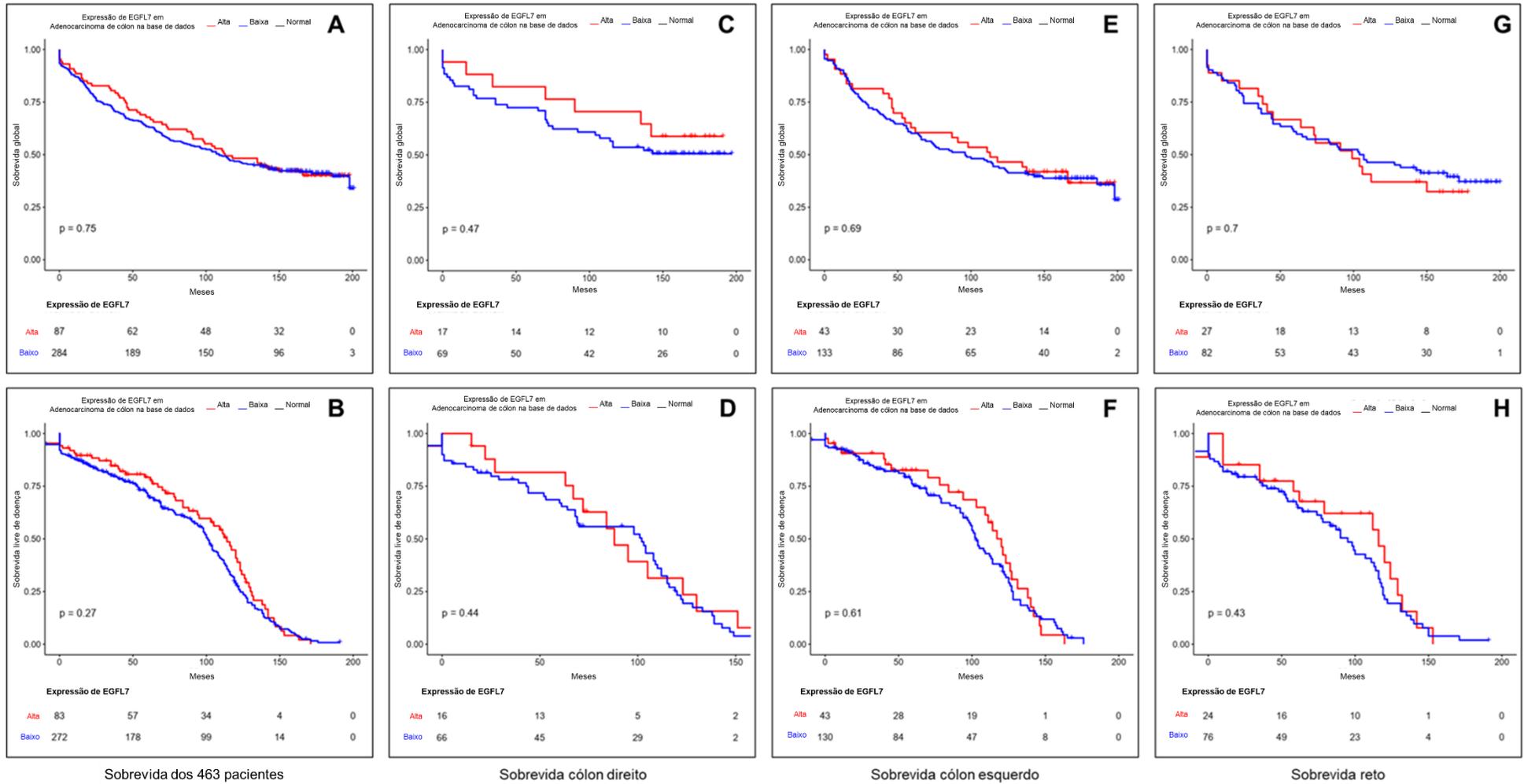


Figura 17: Sobrevida livre de doença e global dos pacientes diagnosticados com CCR considerando a expressão de EGFL7. (A) Sobrevida livre de doença dos 463 pacientes com CCR. (B) Sobrevida global dos 463 pacientes com CCR. (C e D) Sobrevida livre de doença e global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no cólon direito. (E e F) Sobrevida livre de doença e global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no cólon esquerdo. (G e H) Sobrevida livre de doença e global dos pacientes com adenocarcinoma de reto.

Análises *in silico*

Uma vez caracterizada a expressão de EGFL7 em tumores de pacientes através de imunohistoquímica, realizamos uma análise *in silico* com os dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA) para caracterizar a expressão diferencial de genes, no intuito de descrever processos biológicos e vias que estão relacionadas com a expressão deste gene.

Para a análise de expressão gênica foram extraídos dados do TCGA de 298 pacientes diagnosticados com câncer de cólon e 98 pacientes diagnosticados com câncer de reto. Na análise de expressão gênica de *EGFL7* nos pacientes com câncer de cólon encontramos um total de 12 pacientes que apresentaram alta expressão de *EGFL7*, 280 pacientes que apresentaram expressão normal e 6 pacientes que apresentaram baixa expressão. A análise dos pacientes diagnosticados com câncer de reto mostrou que 3 pacientes apresentaram alta expressão de *EGFL7*, 94 apresentaram expressão normal e 1 paciente apresentou baixa expressão (**Tabela 4**).

Tabela 4: Expressão gênica em pacientes diagnosticados com câncer de cólon e câncer reto.

	Expressão Gênica			
	Total de pacientes	Alta expressão	Expressão normal	Baixa expressão
Câncer de cólon	298	12	280	6
Câncer de reto	98	3	94	1

Observamos na análise de sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon ($p = 0,002$), que a alta expressão de *EGFL7* foi associada à menor sobrevida global (**Figura 18**).

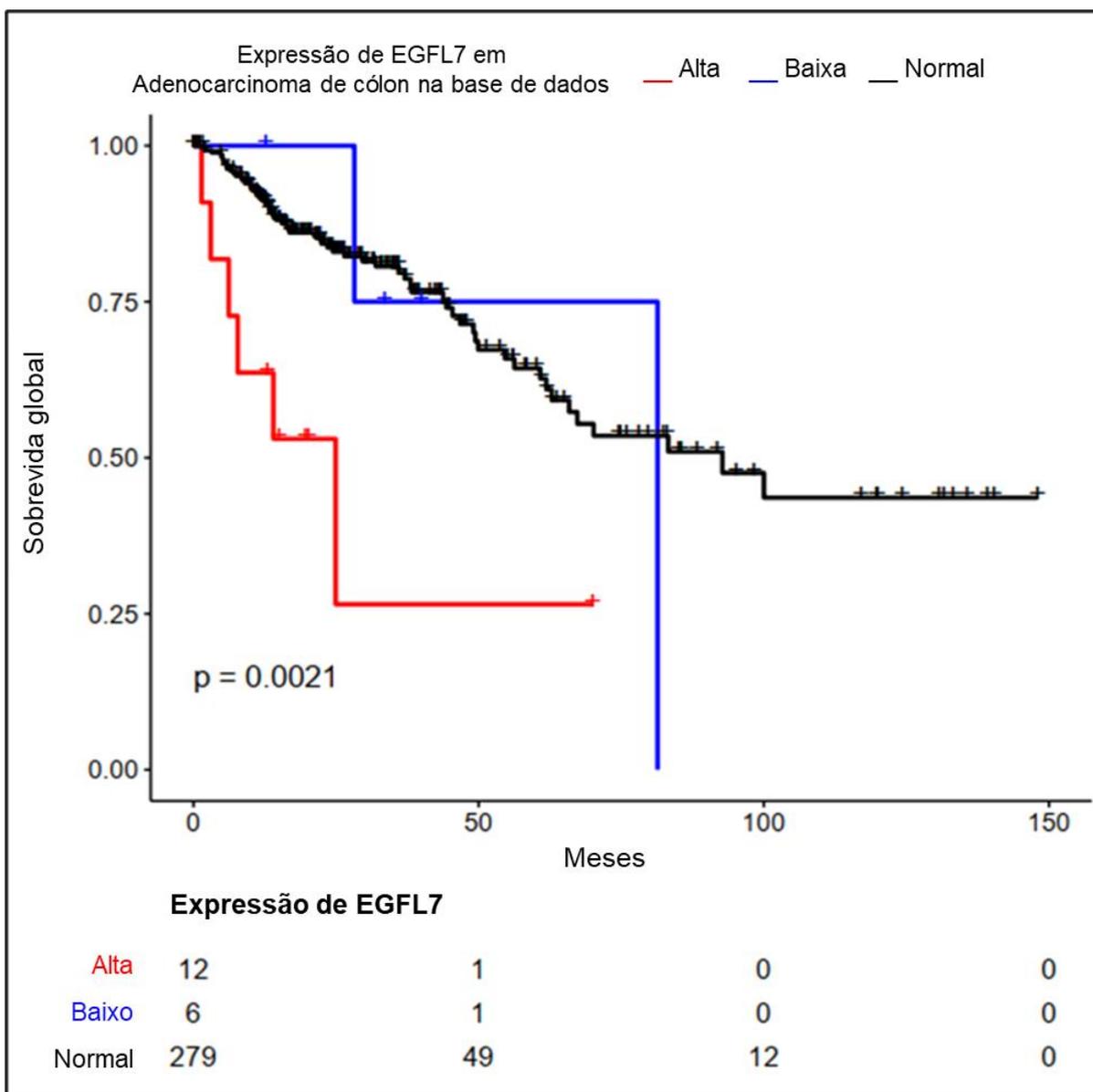


Figura 18: Sobrevida global dos pacientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA) diagnosticados com câncer de cólon baseado na expressão de EGFL7 analisada por sequenciamento de RNA.

Devido à pequena amostragem de pacientes com câncer de reto que apresentaram diferença da expressão de *EGFL7*, decidimos cessar as análises *in silico* nesse grupo tumoral, prosseguindo as análises de genes diferencialmente expressos, Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO) e de vias enriquecidas no KEGG apenas com os pacientes diagnosticados com câncer de cólon.

Na análise de genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com alta expressão de *EGFL7*, encontramos um total de 397 genes com expressão diferencial, sendo 356 genes com alta expressão e 41 genes com baixa expressão (**Tabela 5, Tabela suplementar 1**). Os pacientes com baixa

expressão de *EGFL7* apresentaram um total de 428 genes com expressão diferencial, sendo 4 genes com alta expressão e 424 genes com baixa expressão (**Tabela 5, Tabela suplementar 2**).

Tabela 5: Número de genes diferencialmente expressos considerando como contrastes os pacientes com alta expressão de *EGFL7* vs. expressão normal e baixa expressão de *EGFL7* vs. expressão normal nos casos do *The Cancer Genome Atlas*.

Grupos de contraste	Número de genes diferencialmente expressos	
	Alta expressão	Baixa expressão
Alta expressão de <i>EGFL7</i> vs. expressão normal	356	41
Baixa expressão de <i>EGFL7</i> vs. expressão normal	4	424

Com base nesses dados, comparamos as listas de genes diferencialmente expressos nos 2 contrastes (alta expressão vs. expressão normal e baixa expressão vs. expressão normal). Observamos que 88 genes diferencialmente expressos estavam presentes em ambos os contrastes, sendo assim genes diferencialmente expressos tanto em pacientes com alta quanto em baixa expressão de *EGFL7*. O comportamento de expressão (alta ou baixa expressão) de todos os 88 genes foi o oposto nos 2 contrastes (**Tabela suplementar 3**).

A análise de ontologia gênica (*Gene Ontology* – GO) com os genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon que apresentaram alta expressão de *EGFL7* mostrou um total de 74 termos enriquecidos principalmente relacionados à angiogênese, adesão celular, sinalização mediada por integrina e cascata ERK1/ERK2 e diversos termos relacionados a resposta imunológica (**Figura 19 e Tabela suplementar 4**).

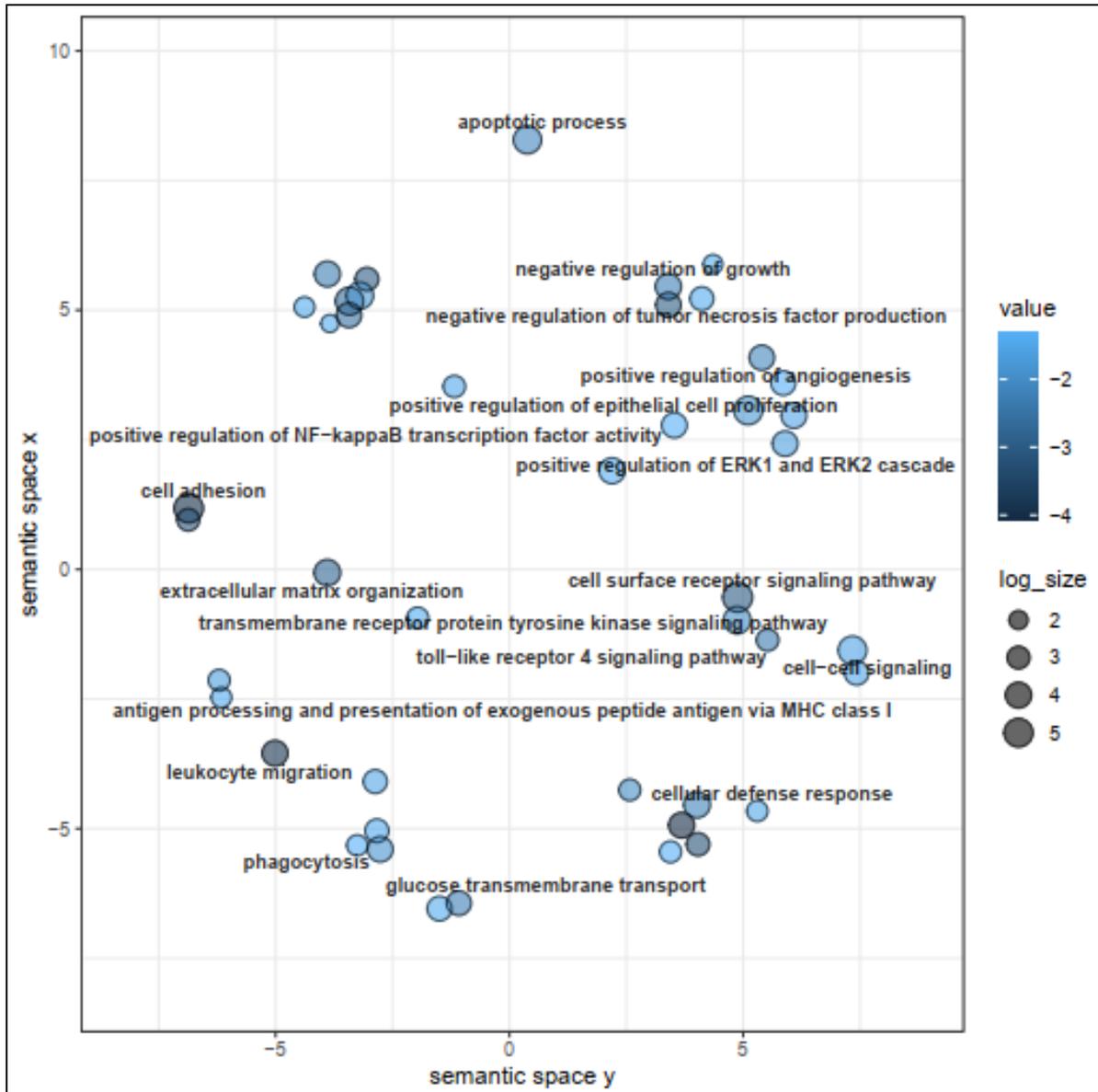


Figura 19: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com alta expressão de EGFL7

As análises de GO com os genes diferencialmente expressos nos pacientes com baixa expressão de *EGFL7* revelou um total de 136 termos enriquecidos relacionados basicamente com os mesmos termos encontrados na análise realizada nos pacientes com alta expressão de *EGFL7*, como angiogênese, adesão celular, sinalização mediada por integrinas e cascata ERK1/ERK2 (**Figura 20 e Tabela suplementar 5**).

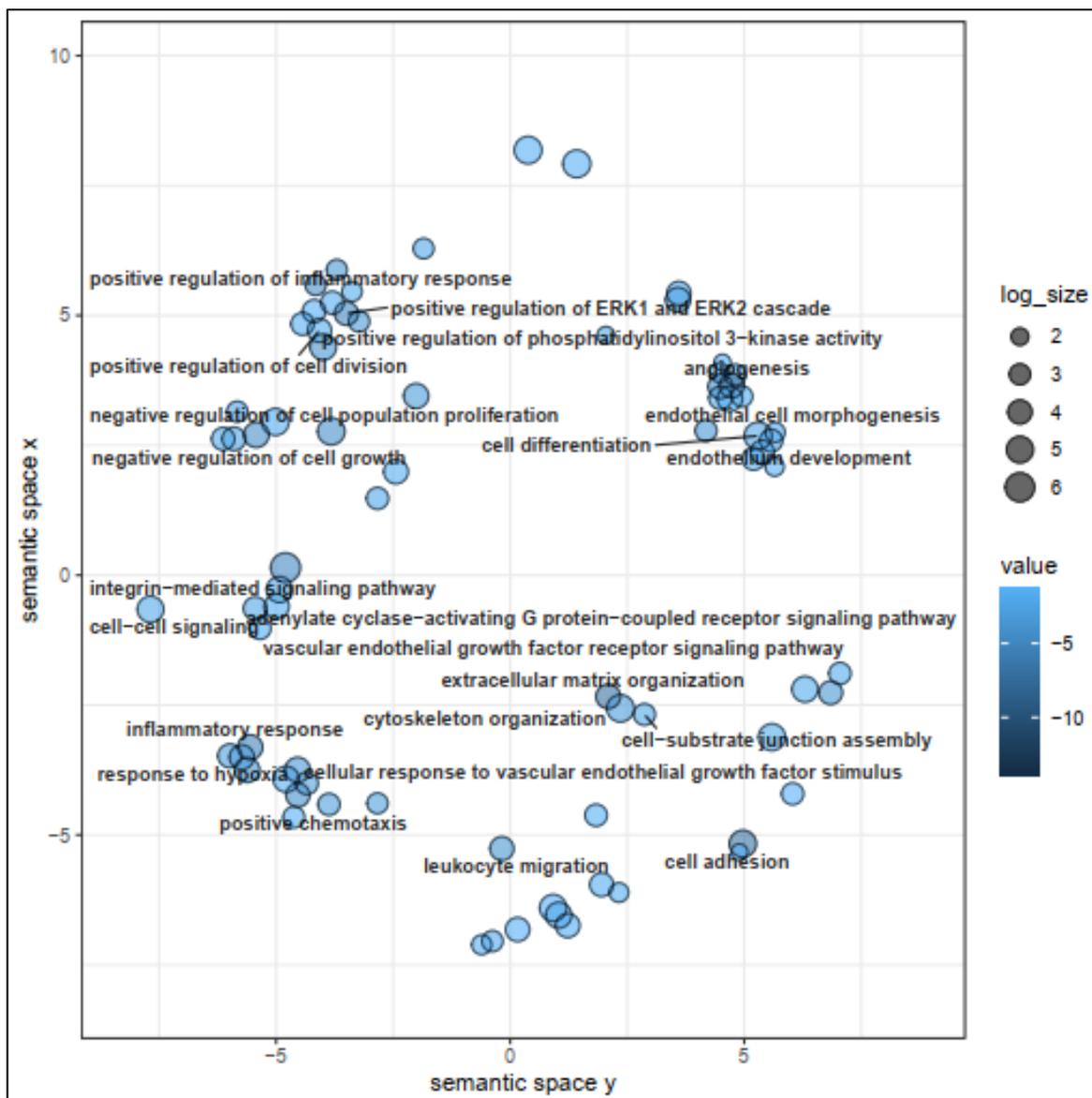


Figura 20: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com baixa expressão de *EGFL7*.

Realizamos uma análise de GO com os 88 genes diferencialmente expressos encontrados tanto nos pacientes com alta expressão quanto nos pacientes com baixa expressão de *EGFL7*, encontramos um total de 43 termos enriquecidos (**Figura 21** e **Tabela suplementar 6**).

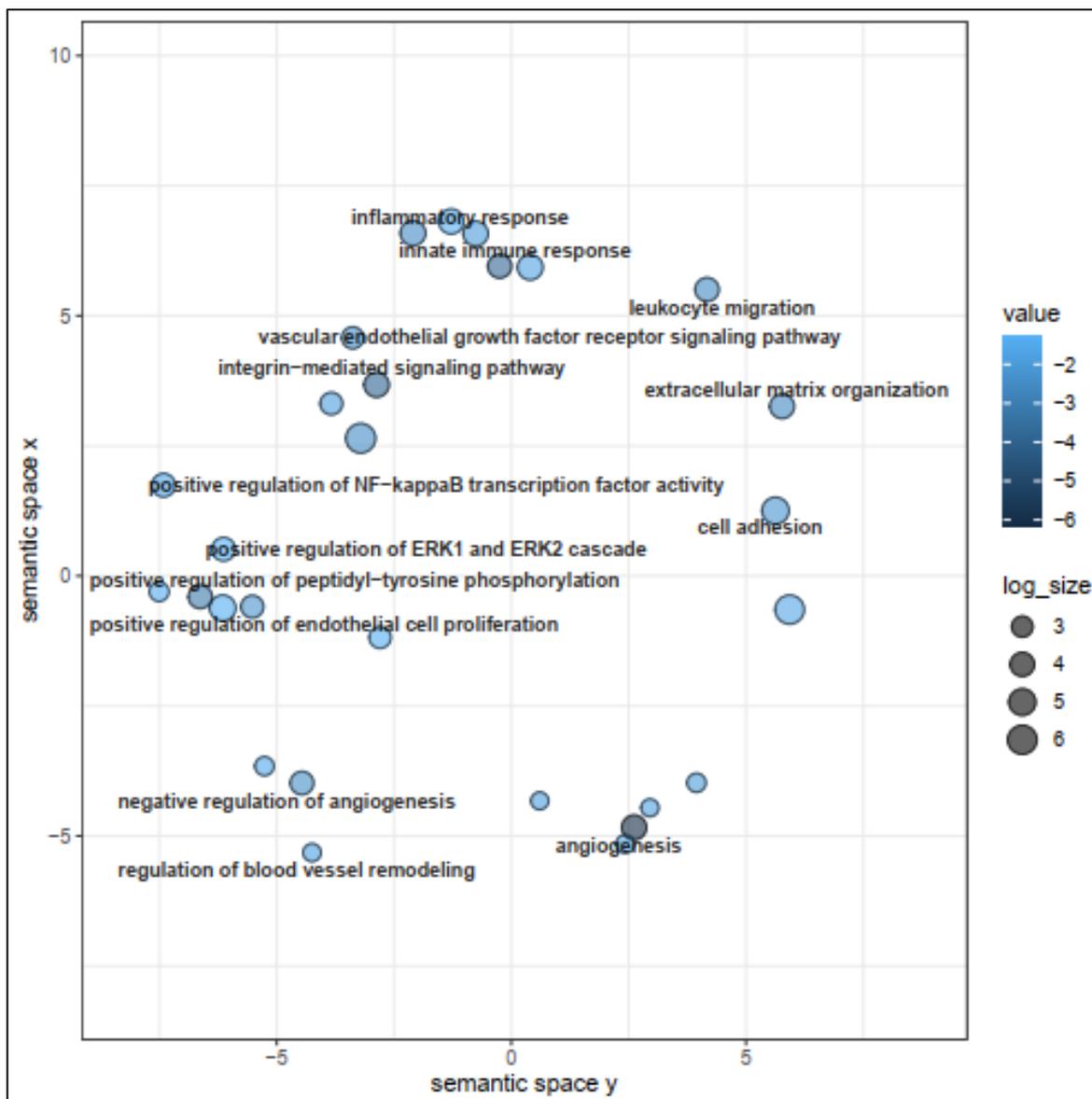


Figura 21: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos em comum nos pacientes diagnosticados com câncer de cólon com alta e baixa expressão de EGFL7.

A análise de vias no KEGG com os genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes com câncer de cólon com alta expressão de *EGFL7* revelou um total de 29 vias enriquecidas (**Figura 22** , **Tabela complementar 7**).

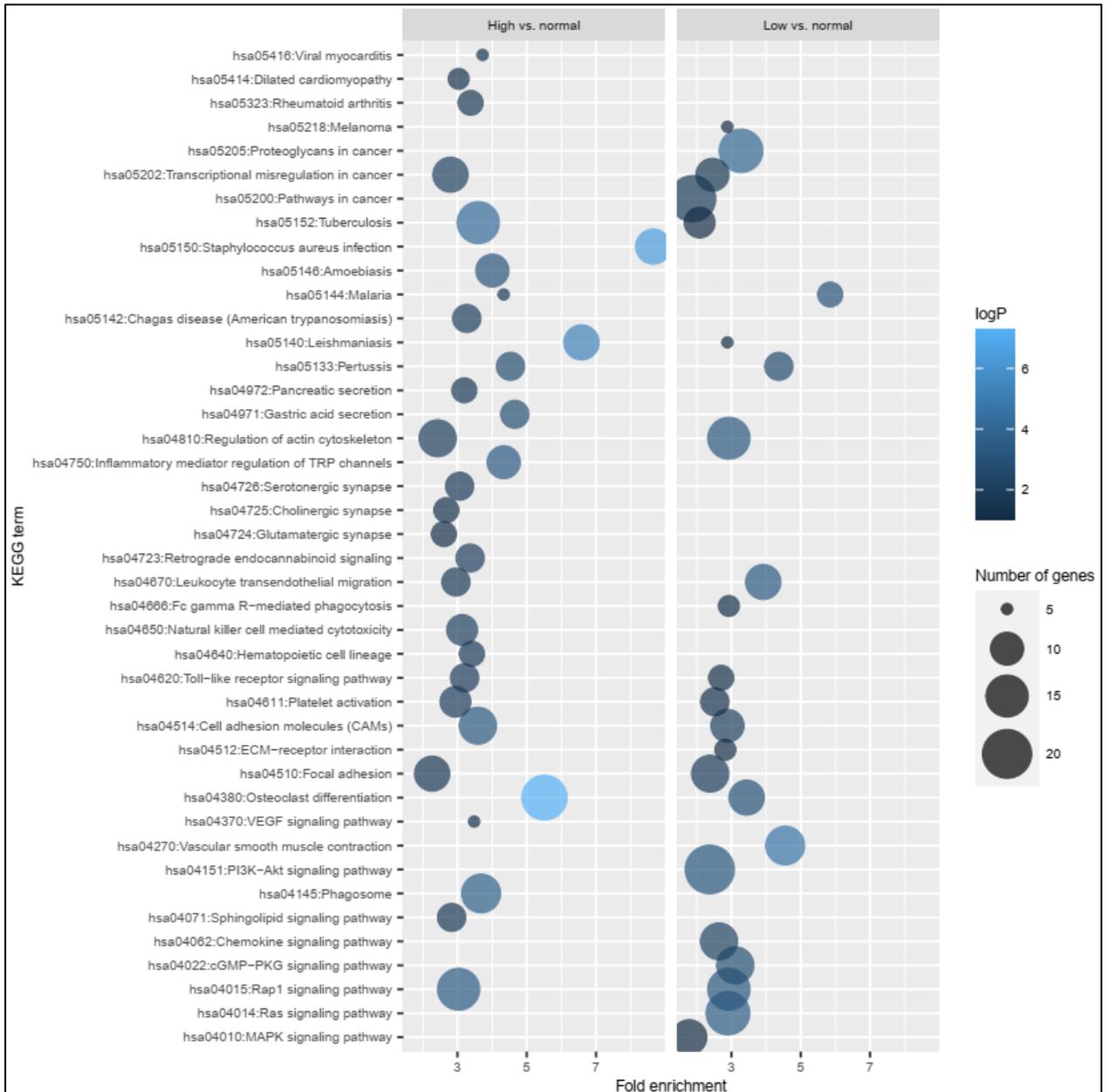


Figura 22: Principais vias enriquecidas na análise no KEGG realizada a partir dos genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com alta expressão de EGFL7 vs expressão normal e baixa expressão de EGFL7 vs expressão normal.

Dentre as vias enriquecidas, ressaltamos algumas (e os genes diferencialmente expressos em nossa análise) que são de grande importante na carcinogênese:

Via de sinalização Rap-1 (n=15): *PRKCG*, *ITGAM*, *FLT4*, *ITGB2*, *ITGA2B*, *ADCY4*, *VEGFC*, *PIK3CD*, *MAPK12*, *MAPK11*, *TIAM1*, *PLCB4*, *RAC3*, *PLCB2*, *FGF11*.

Moléculas de adesão celular (CAM) (n=12): *CD86, NTNG2, HLA-DMA, NLGN2, ITGAM, ITGB2, PECAM1, ITGB8, NRCAM, ESAM, PDCD1LG2, LRRC4C*.

Via de adesão focal (n=11): *PRKCG, PARVG, FLT4, ITGA2B, SPP1, ITGB8, VEGFC, RAC3, PIK3CD, ITGA5, ITGB6*.

Via de sinalização VEGF (n=5): *PRKCG, MAPK11, RAC3, PIK3CD, MAPK12*.

A análise de vias no KEGG com os genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes com adenocarcinoma de cólon com baixa expressão de *EGFL7* revelou um total de 24 vias enriquecidas (**Figura 22, Tabela suplementar 8**). Dentre as vias enriquecidas, ressaltamos algumas (e os genes diferencialmente expressos em nossa análise) que são de grande importante na carcinogênese:

Via de sinalização PI3K/Akt (n=20): *PDGFRB, NGFR, CSF3R, LAMA2, FLT4, PDGFB, FN1, VEGFC, GNG11, FGF7, COL6A2, AKT3, SPP1, GNB4, ITGA7, TEK, GNB5, ITGA5, FGFR1, TLR2*.

Via de sinalização Ras (n=16): *TGFB1, LUM, SDC2, RDX, TWIST2, HSPB2, FN1, MSN, DCN, MAPK11, MRAS, AKT3, PLCG2, ITGA5, FGFR1, TLR2*.

Via de sinalização Rap-1 (n= 15): *PDGFRB, NGFR, ITGAM, FLT4, PDGFB, VEGFC, RASGRP2, RASGRP3, MAPK11, FGF7, MRAS, ADORA2A, AKT3, TEK, FGFR1*.

Vias no câncer (n=18): *PDGFRB, TGFB1, CSF3R, LAMA2, PDGFB, FN1, VEGFC, RASGRP2, GNG11, GLI3, GLI2, RASGRP3, FGF7, AKT3, GNB4, PLCG2, GNB5, FGFR1*.

Adesão focal (n=12): *PDGFRB, LAMA2, FLT4, COL6A2, AKT3, PDGFB, SPP1, FN1, VEGFC, ITGA7, ITGA5, MYL9*.

Interessantemente, a comparação das vias enriquecidas em ambos os contrastes aponta para vias e termos correlatos, em sua maioria relacionados a câncer, carcinogênese, ou resposta imunológica (**Figura 22**).

A análise de fGSEA aponta para um enriquecimento dos genes diferencialmente expressos no grupo com alta expressão de *EGFL7* em relação ao

grupo com expressão normal. Considerando as assinaturas “*H: Hallmark gene sets*”, encontramos o enriquecimento de rejeição a alografos, transição epitélio-mesênquima, resposta inflamatória e sinalização para KRAS (UP) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Hallmarks enriquecidos no grupo com alta expressão de EGFL7 em relação ao grupo com expressão normal

Hallmarks	FDR*	ES**	NES***	Genes
Rejeição de aloenxerto	0,01688092	0,5014685	1,839493	FCGR2B, PRKCG, BCAT1, ITGB2, FGR, CD86, LY86, SRGN, SPI1, HLA-DMA, CRTAM, TLR2, TGFB1, TIMP1
Transição epitelial para mesenquimal	0,01688092	0,4596262	1,837683	SPP1, ADAM12, FAP, BGN, LGALS1, FSTL3, NNMT, LOXL1, VEGFC, BASP1, HTRA1, VIM, ITGA5, TGFB1, PTX3, TIMP1, EMP3, GJA1
Resposta inflamatória	0,223071	0,342619	1,282354	GPC3, MSR1, C5AR1, P2RX7, CD14, ITGA5, APLNR, TLR2, TIMP1, PTGIR, EMP3, CCL7, SLC31A2, SCARF1
Alta sinalização de KRAS	0,18122217	0,3421472	1,390977	SPP1, CD37, ADAM8, HSD11B1, ITGB2, PDCD1LG2, LAPTM5, LY96, MAFB, FCER1G, GYPC, FLT4, NRP1, PECAM1

*False Discovery ratio, **Enrichment score ***Normalized enrichment score

Dos 461 pacientes do *dataset* de adenocarcinoma de cólon do TCGA, 124 foram alocados no grupo com a neoplasia no cólon direito e 231 no cólon esquerdo. Os 106 restantes não estavam especificados no TCGA e foram retirados das análises subsequentes. Dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma no cólon direito, 6 apresentaram alta expressão de *EGFL7*, 1 apresentou baixa expressão e 85 apresentaram expressão normal. Daqueles diagnosticados com adenocarcinoma no cólon esquerdo, 4 apresentaram alta expressão de *EGFL7*, 5 apresentaram baixa expressão e 149 apresentaram expressão normal. Observamos na análise de sobrevida que os pacientes com tumores localizados no cólon direito com alta expressão de *EGFL7* apresentaram pior sobrevida do que os outros pacientes (62,5% dos pacientes com alta expressão de *EGFL7* sobreviveram 12 meses após o diagnóstico vs. 88,9% dos pacientes com expressão normal, $P=0,025$) (**Figura 23**). Não foram encontradas diferenças estatísticas na sobrevida global dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon localizado no lado esquerdo. Por este motivo, decidimos continuar as análises de bioinformática apenas com os pacientes diagnosticados do lado direito.

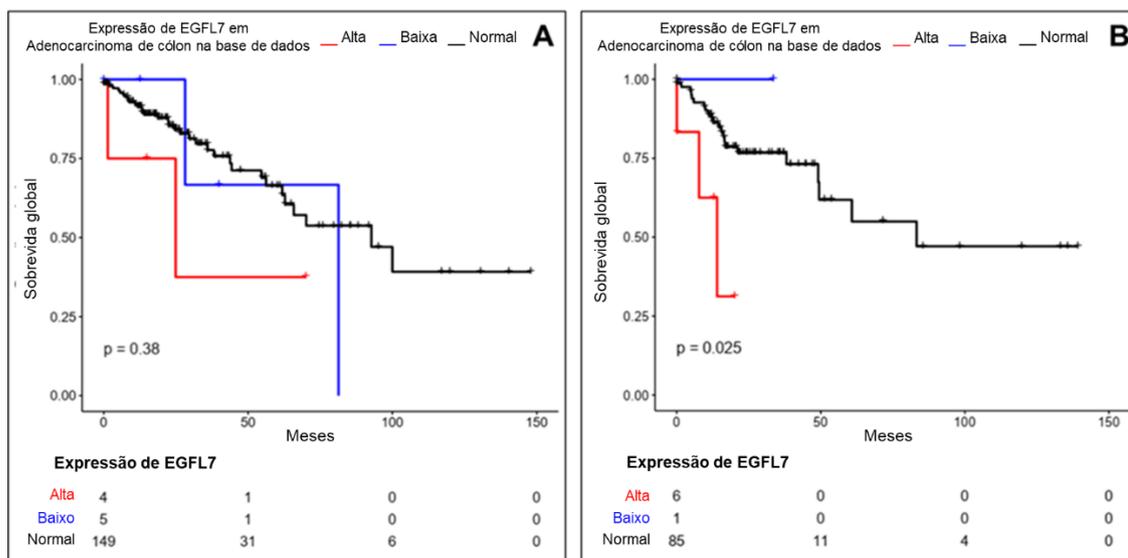


Figura 23: Gráficos de sobrevivência global considerando a expressão de EGFL7 em pacientes com adenocarcinoma de cólon. A) Sobrevivência global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no lado esquerdo. B) Sobrevivência global dos pacientes com adenocarcinoma de cólon localizados no lado direito.

Encontramos na análise de estimativa de infiltrados imunes nas lesões acometidas do lado direito que nos pacientes com alta expressão de *EGFL7* há uma estimativa de redução de células NK inativas e mastócitos ativadas (encontrados pelo algoritmo CIBERSORT), células B e mastócitos ativados (encontrados pelo algoritmo CIBERSORT-ABS) e eosinófilos e neutrófilos (encontrados pelo algoritmo XCELL) (**Tabela suplementar 9**), apontando para uma redução nas células de imunidade inata nos tumores com maior expressão de *EGFL7*.

Discussão

O presente estudo objetivou caracterizar a expressão de EGFL7 em pacientes diagnosticados com CCR e propor processos biológicos e vias possivelmente alteradas pela expressão diferencial deste gene. Encontramos que a baixa expressão de EGFL7 em células neoplásicas está associada a maior comprometimento linfonodal, invasão de vasos linfáticos e recidiva, possivelmente devido à desregulação de processos relacionados à carcinogênese, encontrados em nossa análise *in silico*, tais como inflamação, crescimento celular, adesão celular, angiogênese, e vias importantes como proteoglicanos no câncer, VEGF, Ras, Rap-1, MAPK e PI3K/Akt. Além disso, encontramos que a baixa expressão de EGFL7 está associada a alta expressão de VEGFR2, um receptor de fator de crescimento endotelial vascular que desempenha papel importante na linfangiogênese e angiogênese.

Através de aCGH, nosso grupo de pesquisa descreveu anteriormente alteração no número de cópias na região chr9q34.3 em astrocitoma pilocítico (108) composta por 8 genes. Destes, o gene *EGFL7* se mostrou um promissor objeto de estudo, uma vez que codifica para um fator pró-angiogênico, restrito ao endotélio, que está associado à matriz extracelular (64) e desempenha um papel específico na tubulogênese vascular e regulação da angiogênese (65). Sendo assim, a desregulação da expressão deste gene parece estar relacionada à carcinogênese.

De fato, existem diversos estudos que associam a desregulação da expressão de *EGFL7* em diferentes tipos tumorais. A alta expressão deste gene mostrou-se como um marcador de pior prognóstico em tumores gástricos (87), laríngeos (82), ovarianos (83), gliomas difusos (84-86) e CCR (66), além de que a relação do EGFL7 com a via do EGFR está diretamente relacionada ao desenvolvimento e crescimento de vários tipos tumorais, quando desregulados patologicamente, como gliomas (88), câncer gástrico (89), câncer hepatocelular (90) e câncer renal (91) entre outros. Nosso grupo de pesquisa observou que a alta expressão de *EGFL7* foi associada com pior evolução clínica em pacientes diagnosticados com astrocitoma pilocítico (109) e uma pior sobrevida e Karnofsky Performance Score (KPS) mais baixo em glioblastoma (dados em publicação).

Hansen e colaboradores (110) descreveram a expressão citoplasmática de EGFL7 em mCCR (câncer colorretal metastático), e encontraram associação entre mutação de *KRAS* e maior área de vasos, estimada através da expressão EGFL7 (111). Apesar de o mecanismo ainda ser pouco caracterizado, é possível que o aumento da via MAPK (através da mutação de *KRAS*) possa regular positivamente a expressão de EGFL7, levando a aumento na angiogênese e agressividade tumoral. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa descreveu que a expressão intratumoral endotelial desta proteína é maior em tumores primários de pacientes diagnosticados com CCR estágios II ou III que apresentaram recorrência em relação àqueles que não apresentaram recorrência (112). Por fim, este grupo avaliou a quantidade de EGFL7 circulante (cir-EGFL7) durante o tratamento de pacientes diagnosticados com mCCR com quimioterapia (capecitabina e oxaliplatina) + bevacizumabe. O grupo encontrou uma redução de cir-EGFL7 após o tratamento. Além disso, foi encontrado um pior prognóstico (menor sobrevida livre de doença e sobrevida total dos pacientes) naqueles que possuíam altas quantidades de cir-EGFL7 basal antes do tratamento (93). Em pacientes com metástases hepáticas que foram submetidos a quimioterapia baseada em bevacizumabe seguida por ressecção cirúrgica, foi encontrada baixa expressão intratumoral de mRNA de EGFL7 em metástases associada com maior sobrevida livre de doença (113). Somando-se a estes dados animadores, o estudo de Hansen e colaboradores (112) sugere um valor preditivo importante de área vascular EGFL7 positiva em relação à quimioterapia de primeira linha e bevacizumabe para CCR e sugere a utilização de um mecanismo de bloqueio duplo do VEGFA e EGFL7. Em contraste, os dados encontrados no nosso estudo sugerem que a expressão de EGFL7 em células tumorais do tecido de pacientes não está relacionado com diferenças na sobrevida global e, além disso, a baixa expressão está relacionada com aumento de comprometimento linfonodal, invasão de vasos linfáticos e recidiva de câncer colorretal metastático. Portanto, sugerimos que os dados da literatura encontrados analisando-se apenas a expressão de EGFL7 nos vasos (93, 110-112) podem estar mais relacionados à angiogênese do que aos efeitos da expressão de EGFL7 em si.

Esta evidência pode ser indiretamente corroborada nos estudos em continuidade, como Garcia-Carbonero e colaboradores (114), em um ensaio clínico randomizado de fase II, que mostraram que o tratamento com parsatuzumabe

(anticorpo anti-EGFL7 que bloqueia seletivamente a interação entre EGFL7 e as células endoteliais) falhou na melhora da eficácia da combinação de FOLFOX + bevacizumabe em pacientes com mCCR. De maneira semelhante, outro ensaio clínico randomizado de fase II (95) mostrou que a administração de parsatuzumabe em pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células não melhorou a eficácia do tratamento (bevacizumabe + carboplatina/placlitaxel); inclusive os pacientes que receberam parsatuzumabe apresentaram menor sobrevida livre de progressão ($P=0,0466$, Hazard ratio = 1,686) do que o braço placebo. Ou seja, o efeito do bloqueio da expressão de EGFL7 pelo parsatuzumabe levou a resultados irrisórios perto do bloqueio de VEGF, sugerindo que o principal efeito desta combinação de tratamento estava relacionado com a angiogênese e não com a expressão de EGFL7. Nossos dados *in silico* de sobrevida (alta expressão de *EGFL7* associada a pior sobrevida) também podem ter sofrido este mesmo viés, já que a alta expressão de *EGFL7* detectada pode ser refletida indiretamente pelo aumento da angiogênese, e não pela maior expressão desta proteína nas células neoplásicas, por causa da utilização do material tumoral como um todo (e não só as células neoplásicas) na realização do sequenciamento de RNA. A confirmação desta hipótese poderia ocorrer após estudos *in vitro* e/ou realizando o sequenciamento de nova geração apenas das células neoplásicas.

Um estudo molecular forneceu fortes evidências de que o EGFL7 está altamente envolvido na invasão celular e resistência ao anoikis, um tipo de morte celular programada induzida pela perda de adesão da matriz extracelular (115). Anoikis é um mecanismo de prevenção do crescimento de células independentes em locais inadequados, inibindo assim a colonização de órgãos distantes e a metástase (115, 116). Por essa razão, anoikis tem sido alvo de estudos na carcinogênese, uma vez que a resistência a este processo leva à sobrevivência das células tumorais durante a circulação sanguínea, promovendo a colonização de órgãos distantes da lesão primária. Alguns mecanismos de resistência ao anoikis são crescimento independente de ancoragem e transição epitelial-mesenquimal, dois mecanismos que favorecem a metástase (116). Mostram ainda que a oposição ao anoikis mediado por EGFL7 se dá por meio das vias de sinalização PI3K / AKT (115).

Nossos dados *in silico* mostram processos biológicos enriquecidos relacionados a apoptose, regulação da cascata ERK1 e ERK2, atividade das cascatas

da MAPK e PI3K fortalecendo, portanto, o potencial mecanismo molecular do EGFL7 na mediação do CCR (117). Essas vias e processos encontrados enriquecidos em nossa análise *in silico* desempenham um papel importante em condições normais nas células e na carcinogênese quando desregulados. Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), por exemplo, formam as principais vias de sinalização de proliferação celular da superfície celular para o núcleo. A via MAPK/ERK é uma das mais importantes para a proliferação celular, vários fatores de crescimento e proto-oncogenes, além de estar relacionada a migração, apoptose, senescência e diferenciação celular (118, 119). Dos elementos principais desta via, estão descritos 3 genes *Ras* humanos que codificam 4 proteínas distintas: *H-Ras*, *N-Ras* e duas variantes de splice de *K-Ras* - *K-Ras4A* e *K-Ras4B* (120-122). A família *Ras* de GTPases realiza a transdução de sinais de vários receptores para modular múltiplas vias de sinalização que levam à proliferação celular, sobrevivência e expressão gênica (120). Mutações nas proteínas *Ras* desempenham papéis essenciais no desenvolvimento e manutenção de tumores, além de ser um dos oncogenes mutados mais frequentes no câncer humano, sendo muitas vezes o principal *driver* para o desenvolvimento de diversas neoplasias, incluindo câncer colorretal, sendo *K-Ras* a isoforma mais mutada em cânceres pancreáticos, colorretais e pulmonares (120, 121).

A ativação da via PI3K/AKT junto com mTOR pode regular vários processos biológicos importantes para o crescimento, metabolismo, autofagia e angiogênese (123). A ativação desta via em células tumorais pode regular a angiogênese pelo aumento da secreção de VEGF, modulação da expressão de óxido nítrico e angiopoietinas (123, 124). Portanto, a ligação do VEGF a receptores nas células endoteliais estimula a ativação dessa via, que é essencial para migração de células endoteliais, sendo assim fundamental para o desenvolvimento de vasos sanguíneos, principalmente durante a embriogênese (124). O maior comprometimento linfonodal e invasão de vasos linfáticos nos pacientes com baixa expressão de EGFL7 encontrados em nosso estudo pode ser explicada pela alta expressão de VEGFR2, um receptor de fator de crescimento endotelial que desempenha um papel importante na angiogênese e linfangiogênese. VEGFR2 tem como ligantes clássicos o VEGFA, importante no processo angiogênico e linfangiogênico, além da forma processada dos ligantes VEGFC e VEGFD, fatores importantes no processo linfangiogênico (125). A ativação canônica e não canônica de VEGFR2 ativa vias de sinalização como MAPK,

PI3K/AKT/mTOR, via das GTPases e cascata de sinalização ERK1 e ERK2, vias encontradas alteradas na nossa análise *in silico*, tanto nos pacientes com alta expressão de EGFL7, quanto nos pacientes com baixa expressão dessa proteína. (125). Podemos inferir que a redução na linfangiogênese está indiretamente relacionada ao menor comprometimento linfonodal e à redução na recidiva, já que a via linfática é a principal via de espalhamento de células neoplásicas em CCR (60). Em CCR, estes são fatores importantes a se considerar na determinação do tratamento (60, 61).

Além da desregulação das vias amplamente estudadas na carcinogênese, como por exemplo MAPK/RAS/ERK e PI3K/AKT/mTOR citadas acima, nossa análise *in silico* ainda encontrou outras vias e processos biológicos menos estudados, como a via Rap-1. RAP-1 é uma pequena GTPase que pertence à família Ras das GTPases com potencial para regular e mediar as funções de Ras, além de estar relacionada a muitas das características do câncer (120, 121), atuando como um regulador central da adesão, motilidade celular, polaridade celular e migração (121). Além disso, RAP-1 promove a ativação do receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) e angiogênese através das integrinas. Assim, RAP-1 desempenha um papel importante na invasão e metástase devido à sua regulação da adesão celular e remodelação do citoesqueleto através da sinalização de ERK/MAPK e ativação das integrinas (126). Há evidências de que a ativação de RAP-1 promova a tumorigênese em vários sistemas (121). Em câncer de colón, por exemplo, a ativação de RAP-1 resulta no comprometimento da adesão celular e aumento da adesão célula-matriz, induzindo a disseminação das células neoplásicas. Então, ativação e RAP-1 está relacionada a vários processos biológicos como metabolismo celular, remodelação do citoesqueleto, proliferação celular, migração e metástase por meio da regulação de vias a jusante como, sinalização ERK, AKT, FAK e Wnt (121, 126).

O presente estudo não leva em consideração a expressão do miR-126, contido no locus do gene *EGFL7* e expresso em células endoteliais. A expressão desse microRNA pode ser regulada independentemente da expressão da proteína EGFL7, além disso, há indícios de que miR-126 atue sobre a expressão da proteína EGFL7, além de ser descrito na literatura como um supressor tumoral em CCR.

Assim, existe uma gama de resultados contrastantes relacionando o efeito da expressão de EGFL7 em CCR, e possivelmente estes contrastes estão relacionados às diferentes abordagens metodológicas: (a) vários estudos avaliaram a expressão desta proteína no endotélio vascular (110-112), uma vez que esta proteína é descrita amplamente restrita ao endotélio (64). No entanto, estes estudos acabaram por avaliar indiretamente a angiogênese, e o bloqueio da angiogênese por bevacizumabe (bloqueando a expressão de VEGF) (40) foi mais importante na resposta do paciente do que o bloqueio de EGFL7 por parsatuzumabe; (b) nossa análise *in silico* apontou para o valor prognóstico de *EGFL7* (analisado por sequenciamento de RNA) em CCR, sendo a alta expressão relacionada com pior sobrevida dos pacientes. Possivelmente este resultado está relacionado com a técnica em si, que analisa o tumor como um todo (parênquima e estroma), e os resultados podem estar enviesados por possível aumento de área vascular tumoral (e conseqüentemente maior expressão de *EGFL7* endotelial); (c) nossos dados avaliando a expressão de EGFL7 por imunohistoquímica apenas em células tumorais de pacientes diagnosticados com CCR encontrou baixa expressão de EGFL7 associada a maior comprometimento linfonodal, maior invasão de vasos linfáticos e maior recidiva. Isto pode estar relacionado a maior linfangiogênese, uma vez que encontramos em nossas análises uma associação entre a baixa expressão de EGFL7 e expressão positiva de VEGFR2.

Concluimos, portanto, que a baixa expressão de EGFL7 nas células tumorais dos pacientes diagnosticados com CCR possa estar relacionada com a alta expressão de VEGF2 levando assim a um aumento da invasão linfática e maior linfangiogênese, o que também pode indiretamente levar ao aumento na recidiva. Além disso nossa análise *in silico* aponta que a expressão de *EGFL7* está associada a vias importantes relacionadas a carcinogênese e angiogênese. Estas vias podem estar envolvidas em alterações de funções envolvidas em processos invasivos que conseqüentemente estão relacionados a maior recidiva. Por fim, mais estudos são necessários para aprofundar a associação destes achados clinicopatológicos com os dados moleculares e *in silico* para elucidar o mecanismo de *EGFL7* na gênese do CCR, a fim de serem propostas diferentes abordagens de tratamento para o câncer colorretal utilizando o *EGFL7* como possível biomarcador.

Referências

1. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15065.
2. INCA. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil Ministério da Saúde: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA); 2019.
3. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019;394(10207):1467-80.
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
5. Kumar V, Abbas AK, J. C A. *Patologia Básica – Robbins e Cotran 9ª ed* 2013.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
8. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(6):1688-94.
9. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(6):366-78.
10. Stock C, Pulte D, Haug U, Brenner H. Subsite-specific colorectal cancer risk in the colorectal endoscopy era. *Gastrointest Endosc*. 2012;75(3):621-30.
11. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(4):271-89.
12. Sankaranarayanan R, Swaminathan R, Brenner H, Chen K, Chia KS, Chen JG, et al. Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):165-73.
13. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
14. Bosman FT, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. 417 p. p.
15. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. 2016;11:967-76.
16. Dinarvand P, Davaro EP, Doan JV, Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, et al. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(11):1382-98.
17. Novelli M. The pathology of hereditary polyposis syndromes. *Histopathology*. 2015;66(1):78-87.
18. Sinicrope FA. Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(8):764-73.
19. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):97-101.
20. Bull CJ, Bell JA, Murphy N, Sanderson E, Davey Smith G, Timpson NJ, et al. Adiposity, metabolites, and colorectal cancer risk: Mendelian randomization study. *BMC Med*. 2020;18(1):396.
21. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
22. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:479-507.
23. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997;386(6625):623-7.
24. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
25. Lee GH, Malietzis G, Askari A, Bernardo D, Al-Hassi HO, Clark SK. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(3):300-8.

26. Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(3):411-9.
27. Yang SY, Cho MS, Kim NK. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(4):351-8.
28. Gao XH, Yu GY, Gong HF, Liu LJ, Xu Y, Hao LQ, et al. Differences of protein expression profiles, KRAS and BRAF mutation, and prognosis in right-sided colon, left-sided colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):7882.
29. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):211-9.
30. Wang C, Wainberg ZA, Raldow A, Lee P. Differences in Cancer-Specific Mortality of Right- Versus Left-Sided Colon Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Database Analysis. *JCO Clin Cancer Inform*. 2017;1:1-9.
31. Ghidini M, Petrelli F, Tomasello G. Right Versus Left Colon Cancer: Resectable and Metastatic Disease. *Curr Treat Options Oncol*. 2018;19(6):31.
32. Allard B, Aspeslagh S, Garaud S, Dupont FA, Solinas C, Kok M, et al. Immunology-101: overview of major concepts and translational perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):1-11.
33. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*. 2011;17(3):320-9.
34. Malka D, Lievre A, Andre T, Taieb J, Ducreux M, Bibeau F. Immune scores in colorectal cancer: Where are we? *Eur J Cancer*. 2020;140:105-18.
35. Xiong Y, Wang K, Zhou H, Peng L, You W, Fu Z. Profiles of immune infiltration in colorectal cancer and their clinical significant: A gene expression-based study. *Cancer Med*. 2018;7(9):4496-508.
36. Koi M, Carethers JM. The colorectal cancer immune microenvironment and approach to immunotherapies. *Future Oncol*. 2017;13(18):1633-47.
37. D'Hoore A, Wolthuis AM, Sands DR, Wexner S. Transanal Total Mesorectal Excision: The Work is Progressing Well. *Dis Colon Rectum*. 2016;59(3):247-50.
38. Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, Carethers JM. Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology*. 2000;118(2 Suppl 1):S115-28.
39. Mody K, Baldeo C, Bekaii-Saab T. Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Journal (United States)*. 2018;24(4):165-70.
40. Rosen LS, Jacobs IA, Burkes RL. Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target Oncol*. 2017;12(5):599-610.
41. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2017. p. p.
42. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(10):1626-34.
43. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013;19(5):619-25.
44. Modest DP, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2019;109:70-83.
45. Zeeshan R, Mutahir Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017;17(3):172-82.
46. Talmadge JE, Fidler IJ. The biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010;70(14):5649-69.
47. Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2019;125(23):4139-47.

48. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol.* 2018;71(2):110-6.
49. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(6):464-78.
50. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell.* 2010;140(4):460-76.
51. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol Lett.* 2018;16(1):687-702.
52. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* 2019;9(2):109-27.
53. Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu DM. Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment. *J Clin Med.* 2019;9(1).
54. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(9):1745-70.
55. Hida K, Maishi N, Torii C, Hida Y. Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells. *Int J Clin Oncol.* 2016;21(2):206-12.
56. Chandler KB, Costello CE, Rahimi N. Glycosylation in the Tumor Microenvironment: Implications for Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cells.* 2019;8(6).
57. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(3):321-31.
58. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nature reviews Cancer.* 2014;14(3):159-72.
59. Yu P, Wu G, Lee HW, Simons M. Endothelial Metabolic Control of Lymphangiogenesis. *Bioessays.* 2018;40(6):e1700245.
60. Sundlisaeter E, Dicko A, Sakariassen PO, Sondenaa K, Enger PO, Bjerkvig R. Lymphangiogenesis in colorectal cancer--prognostic and therapeutic aspects. *Int J Cancer.* 2007;121(7):1401-9.
61. Lee YJ, Huh JW, Shin JK, Park YA, Cho YB, Kim HC, et al. Risk factors for lymph node metastasis in early colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2020;35(8):1607-13.
62. Jain RK, Carmeliet P. SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell.* 2012;149(6):1408- e1.
63. Hong G, Kuek V, Shi J, Zhou L, Han X, He W, et al. EGFL7: Master regulator of cancer pathogenesis, angiogenesis and an emerging mediator of bone homeostasis. *J Cell Physiol.* 2018.
64. Schmidt M, Mazière AD, Smyczek T, Gray A, Parker L, Filvaroff E, et al. The role of Eglf 7 in vascular morphogenesis. In: Goode DJCOaJ, editor. *Vascular Development* 283. London John Wiley & Sons Ltd 2007. p. 18 - 36.
65. Parker LH, Schmidt M, Jin S-W, Gray AM, Beis D, Pham T, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Eglf7 regulates vascular tube formation. *Nature.* 2004;428(6984):754-8.
66. Fan C, Yang LY, Wu F, Tao YM, Liu LS, Zhang JF, et al. The expression of Eglf7 in human normal tissues and epithelial tumors. *Int J Biol Markers.* 2013;28(1):71-83.
67. Nichol D, Stuhlmann H. EGFL7: a unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease. *Blood.* 2012;119(6):1345-52.
68. M. FJ, L. C, H. KFS. Eglf7, a Novel Epidermal Growth Factor-Domain Gene Expressed in Endothelial Cells. National Institutes of Health. 2004.
69. Dudvarski Stankovic N, Bicker F, Keller S, Jones DT, Harter PN, Kienzle A, et al. EGFL7 enhances surface expression of integrin alpha5beta1 to promote angiogenesis in malignant brain tumors. *EMBO molecular medicine.* 2018;10(9).
70. Lacko LA, Hurtado R, Hinds S, Poulos MG, Butler JM, Stuhlmann H. Altered fetoplacental vascularization, fetoplacental malperfusion and fetal growth restriction in mice with Eglf7 loss of function. *Development.* 2017;144(13):2469-79.
71. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Breant C, Duarte A, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(9):3225-30.

72. Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 2009;137(6):1124-35.

73. Nichol D, Shawber C, Fitch MJ, Bambino K, Sharma A, Kitajewski J, et al. Impaired angiogenesis and altered Notch signaling in mice overexpressing endothelial Eglf7. *Blood*. 2010;116(26):6133-43.

74. Schmidt MHH, Bicker F, Nikolic I, Meister J, Babuke T, Picuric S, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. *Nature cell biology*. 2009;11(7):873-80.

75. Nikolić I, Stanković ND, Bicker F, Meister J, Braun H, Awwad K, et al. EGFL7 ligates $\alpha\beta 3$ integrin to enhance vessel formation. *Blood*. 2013;121(15):3041-50.

76. Chim SM, Kuek V, Chow ST, Lim BS, Tickner J, Zhao J, et al. EGFL7 is expressed in bone microenvironment and promotes angiogenesis via ERK, STAT3, and integrin signaling cascades. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):82-94.

77. Ebrahimi F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives. *Exp Mol Pathol*. 2014;96(1):98-107.

78. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;97:47-55.

79. Wei L, Chen Z, Cheng N, Li X, Chen J, Wu D, et al. MicroRNA-126 Inhibit Viability of Colorectal Cancer Cell by Repressing mTOR Induced Apoptosis and Autophagy. *Oncotargets Ther*. 2020;13:2459-68.

80. Li XM, Wang AM, Zhang J, Yi H. Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance. *Med Oncol*. 2011;28(4):1054-7.

81. Huang W, Lin J, Zhang H. miR-126: A novel regulator in colon cancer. *Biomed Rep*. 2016;4(2):131-4.

82. Wang XX, Yao XB, Qiang ZS, Zhu HL. Attenuation of EGFL7 inhibits human laryngocarcinoma cells growth and invasion. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3141-55.

83. Oh J, Park SH, Lee TS, Oh HK, Choi JH, Choi YS. High expression of epidermal growth factor-like domain 7 is correlated with poor differentiation and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*. 2014;25(4):334-41.

84. Huang C, Yuan X, Li Z, Tian Z, Zhan X, Zhang J, et al. VE-statin/Egfl7 siRNA inhibits angiogenesis in malignant glioma in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(3):1077-84.

85. Huang C, Yuan X, Wan Y, Liu F, Chen X, Zhan X, et al. VE-statin/Egfl7 expression in malignant glioma and its relevant molecular network. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(3):1022-31.

86. Huang CH, Li XJ, Zhou YZ, Luo Y, Li C, Yuan XR. Expression and clinical significance of EGFL7 in malignant glioma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(11):1737-43.

87. Deng QJ, Xie LQ, Li H. Overexpressed MALAT1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells via increasing EGFL7 expression. *Life Sci*. 2016;157:38-44.

88. Wang F-y-f, Kang C-S, Wang-gou S-y, Huang C-h, Feng C-y, Li X-j. EGFL7 is an intercellular EGFR signal messenger that plays an oncogenic role in glioma. *Cancer Letters*. 2017;384:9-18.

89. Luo BH, Xiong F, Wang JP, Li JH, Zhong M, Liu QL, et al. Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7 (EGFL7) enhances EGF receptor-AKT signaling, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis of gastric cancer cells. *PloS one*. 2014;9(6):e99922.

90. Wu F, Yang LY, Li YF, Ou DP, Chen DP, Fan C. Novel role for epidermal growth factor-like domain 7 in metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;50(6):1839-50.

91. Xu HF, Chen L, Liu XD, Zhan YH, Zhang HH, Li Q, et al. Targeting EGFL7 expression through RNA interference suppresses renal cell carcinoma growth by inhibiting angiogenesis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(7):3045-50.

92. Johnson L, Huseni M, Smyczek T, Lima A, Yeung S, Cheng JH, et al. Anti-EGFL7 antibodies enhance stress-induced endothelial cell death and anti-VEGF efficacy. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3997-4009.

93. Hansen TF, Andersen RF, Olsen DA, Sorensen FB, Jakobsen A. Prognostic importance of circulating epidermal growth factor-like domain 7 in patients with metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and bevacizumab. *Sci Rep.* 2017;7(1):2388.
94. Garcia-Carbonero R, van Cutsem E, Rivera F, Jassem J, Gore I, Jr., Tebbutt N, et al. Randomized Phase II Trial of Parsatuzumab (Anti-EGFL7) or Placebo in Combination with FOLFOX and Bevacizumab for First-Line Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist.* 2017;22(4):375-e30.
95. von Pawel J, Spigel DR, Ervin T, Losonczy G, Barlesi F, Juhasz E, et al. Randomized Phase II Trial of Parsatuzumab (Anti-EGFL7) or Placebo in Combination with Carboplatin, Paclitaxel, and Bevacizumab for First-Line Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist.* 2018;23(6):654-e58.
96. Martins SF, Amorim R, Viana-Pereira M, Pinheiro C, Costa RF, Silva P, et al. Significance of glycolytic metabolism-related protein expression in colorectal cancer, lymph node and hepatic metastasis. *BMC cancer.* 2016;16:535.
97. Martins SF, Garcia EA, Luz MA, Pardal F, Rodrigues M, Filho AL. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2013;10(2):55-67.
98. Samur MK. RCGAToolbox: a new tool for exporting TCGA Firehose data. *PLoS One.* 2014;9(9):e106397.
99. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):e71.
100. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-7.
101. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor.* In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, editors. New York: Springer; 2005. p. 397-420.
102. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(9):R183.
103. Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011;6(7):e21800.
104. Korotkevich G, Sukhov V, Budin N, Shpak B, Artyomov MN, Sergushichev A. Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv.* 2021.
105. Li T, Fu J, Zeng Z, Cohen D, Li J, Chen Q, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(W1):W509-W14.
106. Li T, Fan J, Wang B, Traugh N, Chen Q, Liu JS, et al. TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res.* 2017;77(21):e108-e10.
107. Li B, Severson E, Pignon JC, Zhao H, Li T, Novak J, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol.* 2016;17(1):174.
108. Bidinotto LT, Torrieri R, Mackay A, Almeida GC, Viana-Pereira M, Cruvinel-Carloni A, et al. Copy Number Profiling of Brazilian Astrocytomas. *G3 (Bethesda).* 2016;6(7):1867-78.
109. Brunhara BB, Becker AP, Neder L, Goncalves PG, de Oliveira C, Clara CA, et al. Evaluation of the prognostic potential of EGFL7 in pilocytic astrocytomas. *Neuropathology.* 2021;41(1):21-8.
110. Hansen TF, Christensen R, Andersen RF, Sorensen FB, Johnsson A, Jakobsen A. MicroRNA-126 and epidermal growth factor-like domain 7-an angiogenic couple of importance in metastatic colorectal cancer. Results from the Nordic ACT trial. *Br J Cancer.* 2013;109(5):1243-51.
111. Hansen TF, Nielsen BS, Jakobsen A, Sorensen FB. Intra-tumoural vessel area estimated by expression of epidermal growth factor-like domain 7 and microRNA-126 in primary tumours and metastases of patients with colorectal cancer: a descriptive study. *J Transl Med.* 2015;13:10.

112. Hansen TF, Nielsen BS, Sorensen FB, Johnsson A, Jakobsen A. Epidermal growth factor-like domain 7 predicts response to first-line chemotherapy and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(9):2238-45.
113. Stremitzer S, Zhang W, Yang D, Ning Y, Sunakawa Y, Matsusaka S, et al. Expression of Genes Involved in Vascular Morphogenesis and Maturation Predicts Efficacy of Bevacizumab-Based Chemotherapy in Patients Undergoing Liver Resection. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(11):2814-21.
114. Garcia-Carbonero R, van Cutsem E, Rivera F, Jassem J, Gore I, Jr., Tebbutt N, et al. Randomized Phase II Trial of Parsatuzumab (Anti-EGFL7) or Placebo in Combination with FOLFOX and Bevacizumab for First-Line Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist.* 2017;22(10):1281.
115. Juan Z, Dake C, Tanaka K, Shuixiang H. EGFL7 as a novel therapeutic candidate regulates cell invasion and anoikis in colorectal cancer through PI3K/AKT signaling pathway. *Int J Clin Oncol.* 2021.
116. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3481-98.
117. Yeung S, Smyczek T, Cheng J, Lima A, Molina R, Hamilton P, et al. Abstract 3295: Inhibiting vascular morphogenesis in tumors: EGFL7 as a novel therapeutic target. Proceedings of the 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Orlando, FL. Philadelphia (PA): AACR; 2011.
118. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res.* 2015;35(6):600-4.
119. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet Oncology.* 2005;6(5):322-7.
120. Cerutti C, Ridley AJ. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res.* 2017;358(1):31-8.
121. Shah S, Brock EJ, Ji K, Mattingly RR. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. *Semin Cancer Biol.* 2019;54:29-39.
122. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(1):103-19.
123. Shahcheraghi SH, Tchokonte-Nana V, Lotfi M, Lotfi M, Ghorbani A, Sadeghnia HR. Wnt/beta-catenin and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways in Glioblastoma: Two Main Targets for Drug Design: A Review. *Curr Pharm Des.* 2020;26(15):1729-41.
124. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:51.
125. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(10):611-25.
126. Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(5):369-77.

Anexos

Tabela Suplementar 1: Genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta expressão de EGFL7.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>TNNT1</i>	0,000137	0,011702	7,04547572
<i>EGFL7</i>	2,44E-20	4,13E-16	5,70389048
<i>SPP1</i>	0,001287	0,035835	5,69263288
<i>IGFL2</i>	6,38E-05	0,00756	5,36055532
<i>NXPH4</i>	0,000183	0,013308	5,34784465
<i>MT1A</i>	2,44E-05	0,004549	4,82441292
<i>GPC3</i>	1,87E-05	0,003998	4,78024062
<i>PRAME</i>	0,001037	0,0318	4,76965429
<i>HOXC6</i>	0,000156	0,012621	4,75841428
<i>TRIM7</i>	0,000687	0,025972	4,22162846
<i>APOE</i>	0,00019	0,01357	4,15627371
<i>FCGR2B</i>	8,48E-05	0,009393	4,00530532
<i>TNFSF12-TNFSF13</i>	0,000291	0,017167	3,99921566
<i>PLEKHG4B</i>	5,48E-10	4,64E-06	3,98424561
<i>HOXC11</i>	0,001959	0,044658	3,88735298
<i>KIF26A</i>	0,000455	0,021536	3,8633205
<i>MT1L</i>	2,40E-06	0,001287	3,86214692
<i>CDH16</i>	0,000872	0,029013	3,83118607
<i>PRKCG</i>	0,001361	0,036499	3,64644857
<i>UNC5A</i>	5,40E-06	0,002178	3,63304113
<i>HYAL1</i>	0,00145	0,037837	3,60940559
<i>FAP</i>	0,002239	0,048342	3,60714343

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>HOXC10</i>	1,32E-05	0,003725	3,5782687
<i>SIX2</i>	0,000926	0,030143	3,52213939
<i>ALOX15B</i>	0,000512	0,02257	3,50356559
<i>PPP1R1A</i>	0,000282	0,016896	3,47367386
<i>TRNP1</i>	0,000599	0,02434	3,46646959
<i>RPL39L</i>	0,000765	0,02722	3,43414374
<i>APOC1</i>	0,000556	0,023319	3,36022183
<i>ABCA3</i>	0,001673	0,040699	3,35507751
<i>HOXC4</i>	1,15E-05	0,003432	3,32650553
<i>TREM2</i>	0,000319	0,017925	3,32207758
<i>SPTBN4</i>	2,28E-07	0,000215	3,31497439
<i>AGAP2</i>	0,00017	0,013095	3,28586694
<i>VMO1</i>	8,03E-08	0,000136	3,2470752
<i>CHRFAM7A</i>	0,000638	0,024906	3,21934861
<i>FCGR1A</i>	0,00018	0,013192	3,20354205
<i>MATK</i>	0,000143	0,011914	3,1904543
<i>NRCAM</i>	0,000543	0,0231	3,17032933
<i>GALNT14</i>	0,000227	0,015016	3,15175302
<i>FCGR3A</i>	0,001469	0,038294	3,14502767
<i>SLAIN1</i>	0,00118	0,034009	3,14438066
<i>PNMA2</i>	0,00157	0,039836	3,13678284
<i>C5orf46</i>	3,13E-05	0,005193	3,11772757
<i>C8G</i>	0,00043	0,020903	3,10487007
<i>CPT1C</i>	1,44E-06	0,000939	3,09267001
<i>FAM20A</i>	0,000194	0,013785	3,07247377
<i>CRIP1</i>	0,000187	0,013435	3,05726043

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>MEOX2</i>	0,000846	0,028611	3,05147222
<i>EMX1</i>	0,001395	0,036875	3,05046508
<i>FCGR1B</i>	3,85E-05	0,005819	3,04706385
<i>CPXM2</i>	0,002368	0,049191	3,0433382
<i>SLC11A1</i>	0,000572	0,023673	3,0246017
<i>MSR1</i>	0,001616	0,040184	3,01320118
<i>ITGAM</i>	0,001472	0,038296	3,00681101
<i>ATP6V1B1</i>	3,84E-07	0,00034	3,00293631
<i>CD72</i>	2,34E-06	0,001287	2,9844462
<i>BCAT1</i>	0,00013	0,011428	2,98077025
<i>NFATC1</i>	5,09E-05	0,006881	2,97841045
<i>BHMT</i>	5,94E-06	0,002246	2,96442071
<i>PDE1B</i>	8,09E-05	0,009141	2,95608337
<i>SLC2A5</i>	0,000533	0,022867	2,94505371
<i>CETP</i>	5,83E-07	0,000429	2,92206089
<i>BAI2</i>	3,42E-05	0,005419	2,91241667
<i>FCGR2C</i>	0,000487	0,022041	2,8995037
<i>GPX3</i>	0,00039	0,020061	2,898226
<i>HOMER2</i>	0,00076	0,027146	2,8878392
<i>HOXC8</i>	0,000123	0,011158	2,87079781
<i>SLC6A17</i>	7,93E-08	0,000136	2,85623109
<i>TDO2</i>	0,002321	0,048884	2,85516494
<i>MAPK11</i>	1,45E-07	0,000174	2,81825572
<i>NAT8</i>	0,0003	0,017425	2,81144155
<i>ST6GALNAC5</i>	0,001223	0,034815	2,80892363
<i>S100A8</i>	0,002157	0,047458	2,80731579

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
CD37	0,000886	0,0293	2,80169809
C1orf162	1,89E-05	0,003998	2,78938335
TBX15	6,05E-05	0,007317	2,78857244
GAMT	5,95E-06	0,002246	2,78802867
ZNF467	1,18E-07	0,000167	2,78070967
LILRB3	0,000317	0,017925	2,78037766
BGN	0,002359	0,049191	2,7659899
HOTAIR	0,002277	0,048679	2,74873906
ITGAX	0,000737	0,026974	2,74222522
ADAM8	0,000224	0,014944	2,74188065
PRRX2	0,000421	0,020817	2,7367943
DPEP2	0,000161	0,012713	2,70616122
HCST	0,000127	0,011286	2,70521692
FBXL16	0,002268	0,048643	2,70363419
UST	0,001537	0,039404	2,70329377
CERCAM	0,000146	0,012104	2,70284898
TMEM45A	0,000213	0,01464	2,68954151
C5AR1	0,000259	0,016285	2,68830996
MCHR1	1,04E-07	0,00016	2,68735351
MSMB	2,11E-05	0,004237	2,68640022
ITGB2	0,001783	0,04224	2,68381253
KCNJ5	0,000255	0,016247	2,68289818
C14orf115	0,000241	0,015767	2,67445541
SNCG	0,000254	0,016247	2,67342386
HOXC5	4,15E-05	0,005914	2,67166474
FPR3	0,002053	0,045761	2,66576206

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>MAPK12</i>	4,74E-05	0,006585	2,64839616
<i>VAX2</i>	1,49E-08	6,32E-05	2,64416739
<i>OBSCN</i>	0,000169	0,01307	2,64342035
<i>LY6H</i>	2,07E-05	0,004237	2,63863921
<i>SSPO</i>	5,97E-06	0,002246	2,63396401
<i>HAMP</i>	1,54E-05	0,003725	2,6305089
<i>ITGA2B</i>	3,84E-08	0,00013	2,62909768
<i>DFNA5</i>	0,00082	0,028305	2,6262095
<i>TIAM1</i>	0,001322	0,036169	2,61427997
<i>FCGR1C</i>	3,91E-05	0,005819	2,61033819
<i>MEGF6</i>	0,001934	0,044468	2,609053
<i>ZNF883</i>	0,000485	0,022041	2,6074482
<i>APCDD1L</i>	0,000392	0,020082	2,59623055
<i>GPIHBP1</i>	0,000317	0,017925	2,5694452
<i>XAGE1D</i>	1,24E-06	0,000843	2,56850635
<i>ABCC9</i>	0,001627	0,040184	2,56799698
<i>LILRB2</i>	0,001909	0,044063	2,56567255
<i>C2CD4C</i>	0,000156	0,012621	2,55640032
<i>PILRA</i>	0,000929	0,030143	2,5495184
<i>SPOCD1</i>	0,001232	0,034952	2,5460117
<i>ICAM5</i>	3,59E-05	0,005526	2,54042677
<i>FGR</i>	0,000749	0,026974	2,53832155
<i>SLITRK4</i>	2,78E-06	0,001347	2,53729026
<i>SNCA</i>	0,001011	0,031262	2,53572009
<i>ZNF385D</i>	1,11E-05	0,003368	2,53546745
<i>CD86</i>	0,001169	0,033806	2,52467628

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>NDUFA4L2</i>	0,001674	0,040699	2,51693745
<i>LAIR1</i>	0,001084	0,032397	2,51654542
<i>RBP7</i>	9,56E-05	0,009673	2,51060929
<i>EBF3</i>	0,000129	0,011413	2,51030639
<i>GTSF1</i>	0,001578	0,039903	2,5095503
<i>CYTH4</i>	0,000735	0,026974	2,50445811
<i>C1QA</i>	0,001482	0,038448	2,50315009
<i>ALPK2</i>	0,000496	0,022176	2,49950188
<i>SIX1</i>	0,000903	0,029712	2,49494559
<i>PHLDB2</i>	0,001049	0,031902	2,49448539
<i>P2RX7</i>	0,001006	0,031235	2,49237325
<i>FOLH1</i>	9,60E-05	0,009673	2,48940083
<i>TMEM90B</i>	0,002171	0,047651	2,4857107
<i>HRASLS</i>	2,86E-05	0,00489	2,48512493
<i>GGTA1</i>	0,001991	0,044975	2,47993293
<i>PDCD1LG2</i>	0,002006	0,045188	2,47985407
<i>FGF11</i>	4,86E-06	0,002057	2,47167111
<i>LAPTM5</i>	0,000465	0,021866	2,46808677
<i>LY86</i>	0,000404	0,020382	2,46223332
<i>TNFRSF8</i>	3,28E-05	0,005344	2,46167565
<i>LILRA5</i>	0,000813	0,028235	2,45948563
<i>SDS</i>	0,000954	0,030441	2,45895107
<i>TLE6</i>	0,000455	0,021536	2,45639573
<i>CHST1</i>	5,63E-05	0,007048	2,45096488
<i>BCL2A1</i>	0,001742	0,041737	2,44793454
<i>PARVG</i>	0,000357	0,01896	2,44764717

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>DPY19L2</i>	5,20E-06	0,002147	2,44609434
<i>PIK3R6</i>	9,04E-05	0,009508	2,44089993
<i>HS3ST2</i>	0,002225	0,04821	2,43594199
<i>COPZ2</i>	0,000323	0,017925	2,43333287
<i>TYROBP</i>	0,000683	0,025956	2,4306742
<i>GLTPD2</i>	5,34E-05	0,006992	2,42981659
<i>CD300A</i>	0,000667	0,025577	2,42837455
<i>CECR6</i>	5,02E-07	0,000403	2,42732283
<i>COL15A1</i>	0,000839	0,028485	2,42431727
<i>FNDC4</i>	4,42E-05	0,006186	2,42167089
<i>KCNJ8</i>	0,000171	0,013095	2,41956986
<i>SLN</i>	8,38E-05	0,009393	2,41910303
<i>LGALS1</i>	8,71E-06	0,002783	2,41610212
<i>CAPN14</i>	0,000287	0,017104	2,41505339
<i>ERMN</i>	0,000267	0,016452	2,41187243
<i>LY96</i>	0,000389	0,020061	2,41009573
<i>PLCXD3</i>	0,001631	0,040184	2,40291176
<i>SEMA6B</i>	2,61E-05	0,004703	2,40177273
<i>KCNH3</i>	6,99E-05	0,008225	2,39807576
<i>FSTL3</i>	0,000476	0,022001	2,3879421
<i>CYTL1</i>	0,000111	0,010409	2,3862593
<i>SIGLEC7</i>	0,001493	0,038593	2,38415126
<i>CD14</i>	0,000336	0,018281	2,3841307
<i>EN1</i>	7,39E-06	0,002544	2,381399
<i>PLA2G5</i>	0,001086	0,032397	2,38128374
<i>N4BP3</i>	6,30E-06	0,002272	2,38054654

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>HOXC9</i>	0,001295	0,035836	2,38003465
<i>CCDC88A</i>	0,000392	0,020082	2,37070704
<i>HAVCR2</i>	0,001814	0,042631	2,36867898
<i>MAFB</i>	0,00207	0,046018	2,36588877
<i>NNMT</i>	0,00157	0,039836	2,36490524
<i>TNFSF13B</i>	0,002397	0,04946	2,36280858
<i>IL411</i>	0,000658	0,025339	2,36020657
<i>SLC2A6</i>	1,63E-05	0,00381	2,35688389
<i>PACSIN1</i>	5,53E-05	0,006992	2,35094369
<i>SYT5</i>	0,000157	0,012621	2,35025674
<i>OSCAR</i>	0,000602	0,024356	2,35016573
<i>SLAMF9</i>	0,00042	0,020817	2,34804858
<i>C12orf59</i>	1,44E-05	0,003725	2,34761098
<i>NLRP1</i>	0,001037	0,0318	2,34385366
<i>IQCA1</i>	1,78E-05	0,00397	2,3435622
<i>KCND2</i>	0,001394	0,036875	2,32971405
<i>CTSL1</i>	4,15E-05	0,005914	2,3267209
<i>CHST11</i>	0,000706	0,026344	2,32566856
<i>SERPINF1</i>	0,001347	0,03646	2,32232548
<i>NPR1</i>	0,001565	0,039836	2,32191672
<i>CTSF</i>	0,000834	0,028411	2,32089599
<i>SRGN</i>	0,001793	0,042309	2,3195557
<i>LOC339535</i>	1,64E-05	0,00381	2,31887163
<i>ARHGAP30</i>	0,002442	0,049854	2,31876036
<i>PRAM1</i>	0,001356	0,036499	2,31190778
<i>PTH1R</i>	0,000325	0,017925	2,3063434

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>EPHX3</i>	0,000487	0,022041	2,30200633
<i>KMO</i>	0,000166	0,012958	2,29758064
<i>ADAP2</i>	2,13E-05	0,004237	2,29317503
<i>DOK5</i>	0,001093	0,032505	2,29297828
<i>FCER1G</i>	0,001379	0,03667	2,29172179
<i>PIK3CD</i>	0,001632	0,040184	2,29019089
<i>LOXL1</i>	0,000415	0,020817	2,29005459
<i>PLEKHO1</i>	5,53E-05	0,006992	2,28443135
<i>SLC9A5</i>	3,44E-06	0,001533	2,28089065
<i>KLRG1</i>	4,43E-06	0,001923	2,28000064
<i>LRRC25</i>	0,001494	0,038593	2,27221631
<i>TRPV4</i>	0,001984	0,044868	2,26398699
<i>DOK2</i>	0,002127	0,046906	2,2614154
<i>AVPR1A</i>	0,000173	0,013124	2,25967165
<i>CCDC40</i>	4,30E-05	0,006066	2,25762014
<i>UBE2E2</i>	0,000544	0,023118	2,25526729
<i>TMEM151A</i>	0,002384	0,049317	2,25317633
<i>VEGFC</i>	0,000654	0,025271	2,24343501
<i>AIF1</i>	0,000764	0,02722	2,24232402
<i>B3GNT4</i>	0,000963	0,030603	2,24210239
<i>TNFSF8</i>	0,001008	0,031235	2,24059842
<i>KLRC1</i>	9,18E-05	0,009544	2,24037519
<i>ZNF385A</i>	0,000521	0,02276	2,2403549
<i>MRO</i>	0,000175	0,013124	2,23789337
<i>CCDC102B</i>	2,89E-05	0,004893	2,23617838
<i>PAX4</i>	0,000588	0,024046	2,23617327

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>GIMAP1</i>	0,000791	0,02768	2,23539943
<i>LRRC4C</i>	0,001362	0,036499	2,23441991
<i>HAR1B</i>	0,001176	0,03393	2,23356125
<i>RAC3</i>	0,00057	0,023673	2,23335914
<i>SPI1</i>	0,001949	0,044507	2,23326374
<i>IGFL3</i>	3,68E-05	0,005609	2,23219976
<i>C11orf20</i>	0,001338	0,036331	2,22881387
<i>BASP1</i>	0,001711	0,041305	2,22771483
<i>HLA-DMA</i>	0,001945	0,044472	2,22711726
<i>RAB3B</i>	0,002418	0,049702	2,22684421
<i>SLFN11</i>	0,002364	0,049191	2,2234829
<i>FHAD1</i>	9,50E-05	0,009673	2,22274108
<i>CD33</i>	0,001896	0,043947	2,22140355
<i>HTRA1</i>	0,000617	0,024602	2,21892805
<i>FCGR2A</i>	0,001358	0,036499	2,2177328
<i>BLVRA</i>	0,000374	0,019623	2,21574896
<i>VIM</i>	0,000324	0,017925	2,21461732
<i>NAT8L</i>	0,000403	0,020382	2,21107431
<i>MYO1F</i>	0,00075	0,026974	2,20803315
<i>MS4A14</i>	0,000107	0,010231	2,20742519
<i>CRTAM</i>	0,001845	0,043112	2,20666981
<i>TYMP</i>	0,002201	0,048018	2,2060841
<i>PLEKHO2</i>	3,12E-05	0,005193	2,20552561
<i>APLNR</i>	0,00132	0,036169	2,19980987
<i>TMEM132E</i>	3,50E-05	0,005441	2,19799079
<i>ITGA5</i>	0,001577	0,039903	2,19710604

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>NRGN</i>	1,29E-05	0,003725	2,19654065
<i>ALPL</i>	0,000952	0,030426	2,19639186
<i>IRAK3</i>	0,002175	0,047656	2,19198532
<i>TCF15</i>	7,36E-08	0,000136	2,19185858
<i>NTNG2</i>	0,000137	0,011702	2,190411
<i>ADAMTS10</i>	0,002449	0,049932	2,1896998
<i>LRFN1</i>	0,001596	0,040117	2,18882247
<i>GYPC</i>	0,000744	0,026974	2,18692537
<i>KIAA0495</i>	0,001669	0,040687	2,18510073
<i>EHD3</i>	0,000372	0,019573	2,18200062
<i>LEPREL2</i>	0,00121	0,03463	2,1805368
<i>HRH2</i>	0,000396	0,020221	2,17944135
<i>SOHLH2</i>	0,000562	0,023411	2,17906085
<i>FBLN7</i>	0,000176	0,013124	2,17669733
<i>LOC400043</i>	0,000431	0,020903	2,17660452
<i>MGC45800</i>	0,002455	0,049993	2,17647808
<i>ZMYND15</i>	0,00016	0,012688	2,17534382
<i>TNFAIP8L2</i>	0,000434	0,020936	2,17099559
<i>IGLON5</i>	0,000558	0,023319	2,16929086
<i>HSD17B14</i>	0,00067	0,025611	2,16753037
<i>SIX3</i>	0,000637	0,024906	2,16703536
<i>OPRL1</i>	0,0003	0,017425	2,16593903
<i>IFI30</i>	0,000558	0,023319	2,16481096
<i>JAKMIP2</i>	0,000965	0,030603	2,16480109
<i>KIFC3</i>	0,000551	0,023319	2,16478094
<i>ADD2</i>	0,001603	0,040174	2,16240012

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>POU2F2</i>	0,002208	0,048018	2,16230357
<i>ROBO3</i>	0,001324	0,036169	2,15254354
<i>CHSY3</i>	0,000937	0,030223	2,15200289
<i>POMC</i>	2,30E-05	0,004425	2,1484886
<i>ALOX12B</i>	0,000723	0,026787	2,14431294
<i>CHRNE</i>	1,38E-05	0,003725	2,14060978
<i>CRIP2</i>	3,16E-05	0,005193	2,13544695
<i>ZMYND10</i>	1,92E-05	0,004008	2,13402237
<i>CA11</i>	0,000981	0,031015	2,13346458
<i>STK32B</i>	0,0002	0,014072	2,13225752
<i>NLGN2</i>	0,000818	0,028271	2,12388356
<i>TIE1</i>	0,000742	0,026974	2,12346997
<i>HAPLN4</i>	5,16E-05	0,006881	2,12260394
<i>SLC30A3</i>	1,74E-06	0,00105	2,12217091
<i>HHEX</i>	0,000376	0,019648	2,12009677
<i>PTRF</i>	0,000428	0,020903	2,11881401
<i>GMFG</i>	0,000184	0,013308	2,11807294
<i>TLR2</i>	0,00099	0,031165	2,10813909
<i>IGSF21</i>	0,00122	0,034798	2,10546889
<i>TRPV2</i>	0,00079	0,02768	2,10473025
<i>GIMAP4</i>	0,00166	0,040589	2,10379886
<i>RIMBP3</i>	0,00133	0,036221	2,10374053
<i>BCL6B</i>	0,000324	0,017925	2,10001935
<i>ARHGEF15</i>	0,000295	0,017219	2,09698751
<i>NHLH2</i>	4,06E-05	0,005872	2,09680335
<i>PANX2</i>	0,001289	0,035835	2,09652792

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
SOX18	3,41E-05	0,005419	2,09344103
GPR85	1,36E-05	0,003725	2,09287337
GJA5	0,001097	0,032548	2,08899392
C17orf60	0,000198	0,014011	2,08814055
ESAM	2,53E-06	0,001287	2,08642381
SH2D3C	0,000107	0,010231	2,08638606
FLT4	0,001212	0,034635	2,08350674
FCN3	0,000232	0,01523	2,08130285
FAM78A	0,001353	0,03649	2,07765328
C1orf54	6,31E-05	0,007533	2,07713494
EVL	0,000854	0,028657	2,07382729
LYL1	2,80E-05	0,004888	2,07068038
GDF6	0,002296	0,048847	2,06699919
HMSD	4,02E-05	0,005872	2,061067
SOX17	0,000321	0,017925	2,05765298
FAM69B	2,50E-05	0,004549	2,05677742
RAB42	0,000772	0,027376	2,05591521
ST3GAL6	0,000823	0,028326	2,04869105
TGFB1	0,000989	0,031165	2,04843448
EBF2	5,87E-05	0,00724	2,04651646
ADCY4	0,000293	0,017215	2,04607396
ECSCR	0,00038	0,019765	2,0448224
CLEC1A	0,000217	0,014792	2,04451935
RCN3	0,001008	0,031235	2,04411165
HSPA12B	0,000726	0,026799	2,04398379
PTX3	0,000973	0,030798	2,04281299

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>NOVA2</i>	1,64E-05	0,00381	2,04265964
<i>C19orf38</i>	0,001906	0,044057	2,04006002
<i>TIMP1</i>	0,000609	0,02444	2,03516746
<i>TMEM91</i>	7,61E-06	0,002544	2,0314999
<i>GNB4</i>	0,002442	0,049854	2,0286452
<i>KLHDC8B</i>	9,60E-05	0,009673	2,02756194
<i>NTRK1</i>	5,66E-05	0,007048	2,02677563
<i>PDE6B</i>	0,000288	0,017118	2,02594895
<i>PECAM1</i>	7,81E-05	0,008883	2,02209124
<i>ODF3B</i>	0,001508	0,038881	2,02110793
<i>CXorf36</i>	0,000488	0,022041	2,02032773
<i>KCND1</i>	0,000271	0,016478	2,01910846
<i>HVCN1</i>	0,001105	0,032718	2,01769656
<i>NRP1</i>	0,002264	0,048619	2,01351742
<i>LOXHD1</i>	1,06E-08	6,00E-05	2,01223275
<i>VSIG10L</i>	0,001051	0,031902	2,01037643
<i>LIMS3-LOC440895</i>	0,00038	0,019765	2,01004718
<i>ANKRD6</i>	0,002204	0,048018	2,00787947
<i>SHANK1</i>	4,95E-05	0,006764	2,00413557
<i>SSTR2</i>	0,002408	0,04962	2,00244599
<i>PLCB2</i>	0,001618	0,040184	2,00156538
<i>C14orf139</i>	0,001415	0,037157	2,00004439
<i>MGST1</i>	0,000533	0,022867	-2,0118095
<i>GPR39</i>	8,62E-05	0,009425	-2,0454241
<i>GPR160</i>	0,000928	0,030143	-2,0528708
<i>CXADR</i>	0,0001	0,009897	-2,0594549

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>HOXA10</i>	0,002215	0,048104	-2,0787334
<i>LOC100216001</i>	0,001837	0,042984	-2,1162621
<i>ITGB8</i>	0,00048	0,022041	-2,1288382
<i>WNK2</i>	0,000746	0,026974	-2,1676324
<i>CDX1</i>	0,001327	0,036202	-2,1844311
<i>HNF1B</i>	0,000175	0,013124	-2,2213406
<i>SLC5A1</i>	0,000476	0,022001	-2,2343786
<i>GIPC2</i>	0,000163	0,012865	-2,3313132
<i>ITGB6</i>	5,24E-07	0,000403	-2,3367232
<i>BCL11A</i>	0,001128	0,032937	-2,3368474
<i>RNF43</i>	0,001614	0,040184	-2,3625084
<i>DAPK2</i>	0,000133	0,011516	-2,3647934
<i>ZBTB10</i>	0,000489	0,022041	-2,3818869
<i>TSPAN6</i>	5,17E-05	0,006881	-2,4246985
<i>SLC22A3</i>	0,000912	0,029935	-2,4344344
<i>ATP9A</i>	4,85E-05	0,006683	-2,4518377
<i>HOXA3</i>	0,000527	0,02282	-2,4522959
<i>NAALADL2</i>	0,000532	0,022867	-2,4799886
<i>CHRM3</i>	0,001997	0,045049	-2,5412709
<i>NSUN7</i>	2,39E-05	0,004549	-2,5591634
<i>SLC2A12</i>	0,00132	0,036169	-2,5789294
<i>AK3L1</i>	0,000767	0,027241	-2,6443343
<i>HOXA11AS</i>	0,001972	0,044772	-2,6660115
<i>CHN2</i>	0,000205	0,014265	-2,7112786
<i>HOXA9</i>	0,002073	0,046018	-2,7918007
<i>RASSF10</i>	0,002363	0,049191	-2,9122308

Continua.

Continuação da tabela suplementar 1.

Gene	Valor de p	FDR	Fold change
<i>TFCP2L1</i>	0,00083	0,028391	-3,0706303
<i>BMP5</i>	0,001288	0,035835	-3,1655774
<i>TMPRSS13</i>	0,002015	0,045275	-3,5107816
<i>PLCB4</i>	0,000577	0,023835	-3,5841092
<i>SOSTDC1</i>	0,001366	0,036535	-4,344683
<i>OXGR1</i>	7,08E-05	0,008276	-4,997522
<i>ISX</i>	0,000641	0,024906	-5,1930102
<i>FLJ32063</i>	0,002039	0,045684	-5,5249904
<i>CXCL14</i>	0,000251	0,016233	-5,9145088
<i>CFTR</i>	7,02E-07	0,000496	-6,4868827
<i>LEFTY1</i>	1,81E-05	0,003975	-15,572293

Tabela Suplementar 2: Genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com baixa expressão de EGFL7.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>CYP1A1</i>	0,000729	0,036659	3,756245
<i>UTS2R</i>	2,25E-05	0,008224	2,840991
<i>FXD4</i>	0,001198	0,047617	2,544075
<i>LOC729467</i>	0,000275	0,021597	2,471167
<i>TMEM91</i>	0,000988	0,042597	-2,00069
<i>TBXA2R</i>	0,000688	0,035763	-2,03115
<i>KANK3</i>	0,000861	0,039724	-2,03608
<i>TUBB6</i>	0,000515	0,031068	-2,07227
<i>ST3GAL2</i>	0,000141	0,016232	-2,0752
<i>CHST12</i>	1,13E-06	0,002995	-2,11973
<i>TMEM149</i>	0,000571	0,033204	-2,12184
<i>RBM38</i>	0,000627	0,034511	-2,12882
<i>ARMC9</i>	0,000111	0,016155	-2,14302
<i>FAM176B</i>	0,000255	0,021246	-2,15258
<i>NUMBL</i>	0,000107	0,016155	-2,16272
<i>NPR2</i>	0,000739	0,037014	-2,17114
<i>LCA5</i>	0,001175	0,047269	-2,18805
<i>NOVA2</i>	0,000199	0,018822	-2,27803
<i>JAZF1</i>	0,00121	0,047914	-2,27893
<i>YPEL4</i>	0,001123	0,046162	-2,28416
<i>GIPC3</i>	0,000465	0,029136	-2,2934
<i>FMNL3</i>	0,000532	0,031737	-2,29855
<i>GPR146</i>	0,000313	0,02303	-2,30537
<i>HIP1</i>	0,00096	0,042367	-2,30995

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>C3orf54</i>	1,86E-06	0,00393	-2,31893
<i>ADORA2A</i>	0,000966	0,042416	-2,3251
<i>FAM167B</i>	2,22E-05	0,008224	-2,33285
<i>OTOA</i>	8,22E-05	0,014811	-2,35075
<i>MCAM</i>	0,000426	0,027978	-2,35933
<i>CCDC102A</i>	0,000111	0,016155	-2,36253
<i>MAPK11</i>	0,000906	0,040936	-2,3708
<i>ROBO4</i>	0,000345	0,024971	-2,37994
<i>LOXL3</i>	0,000201	0,018822	-2,38179
<i>NOTCH4</i>	0,000198	0,018822	-2,4054
<i>CLEC1A</i>	0,000687	0,035763	-2,40725
<i>LIMD2</i>	0,001117	0,046137	-2,41513
<i>REM1</i>	0,000884	0,040459	-2,41836
<i>UBTD1</i>	9,17E-05	0,015683	-2,41984
<i>CYGB</i>	0,000765	0,037445	-2,42377
<i>GRASP</i>	0,000199	0,018822	-2,42386
<i>SLC31A2</i>	0,000209	0,019047	-2,42717
<i>ESAM</i>	1,96E-05	0,008224	-2,43861
<i>KIF17</i>	0,000307	0,022811	-2,44238
<i>PDE6B</i>	0,000603	0,034286	-2,44627
<i>PBX3</i>	3,49E-05	0,00967	-2,4594
<i>FOXS1</i>	0,001119	0,046137	-2,47193
<i>GRRP1</i>	0,000149	0,016456	-2,47693
<i>GMFG</i>	0,000716	0,036475	-2,48001
<i>DOK3</i>	0,001236	0,048412	-2,49042
<i>GPR162</i>	0,000239	0,020593	-2,49574

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>LOC646762</i>	0,000102	0,016155	-2,50606
<i>GABRD</i>	0,000637	0,034787	-2,51415
<i>PLEKHG2</i>	9,08E-05	0,015683	-2,52306
<i>CSRP2</i>	0,000133	0,016232	-2,52941
<i>KLHDC8B</i>	0,000122	0,016155	-2,54298
<i>DIP2C</i>	0,000924	0,041391	-2,55278
<i>GPR116</i>	0,000618	0,034339	-2,55596
<i>DENND5A</i>	9,42E-05	0,015799	-2,55872
<i>USHBP1</i>	0,000137	0,016232	-2,55898
<i>LBH</i>	0,000625	0,034511	-2,55991
<i>NTNG2</i>	0,000587	0,033579	-2,57459
<i>SOX17</i>	0,000419	0,027858	-2,58125
<i>GNB5</i>	3,71E-05	0,00967	-2,58171
<i>STARD8</i>	0,001167	0,047235	-2,58179
<i>IGFBP7</i>	0,000541	0,03191	-2,58286
<i>TAL1</i>	0,000657	0,035188	-2,58607
<i>PLEKHF1</i>	6,38E-05	0,012707	-2,59149
<i>RAMP3</i>	3,46E-05	0,00967	-2,59371
<i>C20orf160</i>	0,000118	0,016155	-2,59385
<i>LOC728392</i>	0,001111	0,046035	-2,60061
<i>ZNF671</i>	0,001182	0,047331	-2,60354
<i>MMRN2</i>	0,000879	0,040358	-2,60474
<i>TMEM86A</i>	3,38E-05	0,00967	-2,60671
<i>PLEKHO1</i>	0,000441	0,028263	-2,61728
<i>PKD2</i>	0,000158	0,017121	-2,61768
<i>RASIP1</i>	4,09E-05	0,010334	-2,62526

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
SOX7	0,000346	0,024971	-2,63229
FHL3	0,000228	0,019965	-2,63727
CNRIP1	0,000774	0,037804	-2,64132
BEND5	0,00118	0,047331	-2,64275
CALHM2	0,000262	0,021246	-2,6484
MYCT1	0,000122	0,016155	-2,6493
AFAP1L1	0,000432	0,02814	-2,66326
MSN	0,000298	0,022422	-2,67135
TGFB111	0,000181	0,018449	-2,67434
TMOD1	0,000667	0,035414	-2,67567
HSD17B14	0,001221	0,048101	-2,67851
CYYR1	0,000122	0,016155	-2,68059
CHST7	1,78E-05	0,007735	-2,68356
CYP27C1	0,000414	0,027692	-2,68495
QKI	0,001191	0,047582	-2,68624
CD34	4,25E-05	0,010342	-2,68805
ARHGEF17	0,000658	0,035188	-2,69221
TRPC6	0,000263	0,021246	-2,69885
VAMP5	0,000255	0,021246	-2,70609
SOX18	2,93E-05	0,00919	-2,71655
MFGE8	0,000423	0,0279	-2,72017
PECAM1	2,89E-05	0,00919	-2,72232
CMTM3	0,000393	0,02707	-2,72433
NLRP3	0,001146	0,046792	-2,72471
GNAZ	0,000593	0,0338	-2,73263
PRR16	0,001011	0,043241	-2,74067

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>NRP1</i>	0,001038	0,044061	-2,74479
<i>ITPRIPL1</i>	0,00114	0,04675	-2,74543
<i>CRIP2</i>	3,58E-05	0,00967	-2,74604
<i>TGFB1</i>	0,000546	0,032112	-2,74682
<i>SSTR2</i>	0,000976	0,042597	-2,75491
<i>HLX</i>	3,70E-05	0,00967	-2,76108
<i>WASF1</i>	0,001168	0,047235	-2,76454
<i>MYO1F</i>	0,001237	0,048412	-2,76517
<i>IRF5</i>	1,76E-05	0,007735	-2,7818
<i>GAMT</i>	0,000679	0,035702	-2,7822
<i>FAM126A</i>	0,000988	0,042597	-2,78441
<i>LHX6</i>	0,001281	0,049427	-2,78644
<i>ERG</i>	0,000493	0,030287	-2,79623
<i>IRF8</i>	0,000275	0,021597	-2,81662
<i>FSTL1</i>	0,000686	0,035763	-2,81992
<i>ERO1LB</i>	0,000107	0,016155	-2,82894
<i>FAM171B</i>	0,000461	0,029136	-2,82976
<i>SDC2</i>	0,000525	0,031443	-2,83667
<i>P2RY6</i>	0,000442	0,028263	-2,83914
<i>LGALS1</i>	8,18E-05	0,014811	-2,83981
<i>ARHGEF15</i>	0,000141	0,016232	-2,84452
<i>PCDH12</i>	4,51E-05	0,010406	-2,84975
<i>IFI30</i>	0,000485	0,030077	-2,85027
<i>NDRG4</i>	0,000919	0,041382	-2,85249
<i>SYDE1</i>	0,000198	0,018822	-2,85961
<i>GNB4</i>	0,000807	0,038382	-2,86007

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>PDGFB</i>	2,52E-05	0,008698	-2,86325
<i>WIPF1</i>	0,000521	0,031271	-2,8651
<i>TRPC1</i>	0,000801	0,038232	-2,87216
<i>GPR161</i>	0,000287	0,021984	-2,87444
<i>TLR2</i>	0,000501	0,030557	-2,88084
<i>COL18A1</i>	0,000408	0,027692	-2,88457
<i>TCEAL3</i>	0,000134	0,016232	-2,88988
<i>RAMP2</i>	5,96E-06	0,006444	-2,89155
<i>ZNF467</i>	3,14E-05	0,00967	-2,90731
<i>ALPL</i>	0,000832	0,039029	-2,90799
<i>PLXDC1</i>	0,000142	0,016232	-2,91705
<i>CFL2</i>	6,67E-05	0,012985	-2,93356
<i>TNFRSF18</i>	0,000839	0,039029	-2,93684
<i>GJA4</i>	2,08E-05	0,008224	-2,93853
<i>TWIST2</i>	0,00028	0,021707	-2,94678
<i>HTRA1</i>	0,000534	0,031772	-2,94846
<i>FLI1</i>	0,000615	0,034339	-2,95762
<i>RFTN1</i>	0,000166	0,017683	-2,96062
<i>DZIP1L</i>	0,000279	0,021707	-2,966
<i>COL13A1</i>	0,001024	0,043599	-2,96774
<i>ELTD1</i>	3,27E-05	0,00967	-2,97252
<i>S1PR1</i>	0,000219	0,019653	-2,97388
<i>PCDH17</i>	0,000376	0,026311	-2,97568
<i>TRPV2</i>	0,000247	0,020987	-2,98092
<i>CHN1</i>	0,00026	0,021246	-2,98105
<i>GNG11</i>	1,19E-05	0,006979	-2,98421

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>MAGEH1</i>	0,000179	0,018449	-2,99196
<i>EBF4</i>	0,000801	0,038232	-3,00682
<i>SRRM3</i>	0,000966	0,042416	-3,01217
<i>TIMP2</i>	0,001249	0,048761	-3,01545
<i>HVCN1</i>	0,000129	0,016232	-3,03137
<i>GLIS2</i>	0,000661	0,035188	-3,03263
<i>RGS19</i>	5,07E-05	0,011235	-3,03822
<i>PDGFRB</i>	0,001173	0,047269	-3,03865
<i>A4GALT</i>	0,000933	0,041724	-3,04707
<i>CLEC14A</i>	9,57E-06	0,006613	-3,05927
<i>FAM124A</i>	0,000201	0,018822	-3,06528
<i>TNFRSF4</i>	3,70E-05	0,00967	-3,07534
<i>SH2D3C</i>	1,11E-05	0,006695	-3,07568
<i>WTIP</i>	6,47E-05	0,012742	-3,08306
<i>TMEM22</i>	5,81E-05	0,01172	-3,08906
<i>RGAG4</i>	0,00072	0,036475	-3,08956
<i>CNTLN</i>	0,000614	0,034339	-3,09432
<i>CALCRL</i>	0,000194	0,018822	-3,09704
<i>KCNJ8</i>	0,000323	0,023684	-3,1033
<i>LST1</i>	0,000501	0,030557	-3,1215
<i>CHST1</i>	0,000133	0,016232	-3,12319
<i>FBXL7</i>	0,000289	0,022031	-3,13496
<i>TCEA2</i>	0,000301	0,022555	-3,13586
<i>SMARCA1</i>	0,001227	0,048229	-3,13964
<i>LHFP</i>	0,000118	0,016155	-3,14656
<i>LYL1</i>	9,51E-07	0,002995	-3,15528

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>SGCE</i>	0,000987	0,042597	-3,15605
<i>MEIS3</i>	0,000465	0,029136	-3,15988
<i>CAP2</i>	0,000617	0,034339	-3,16585
<i>HSPB2</i>	9,05E-05	0,015683	-3,16907
<i>SAMD11</i>	0,001289	0,049541	-3,17127
<i>EMCN</i>	8,89E-05	0,015683	-3,17445
<i>ECSCR</i>	2,00E-05	0,008224	-3,18167
<i>ACTA2</i>	0,00098	0,042597	-3,19146
<i>MFRP</i>	0,00018	0,018449	-3,19274
<i>C1orf162</i>	0,000281	0,021707	-3,1984
<i>FAM110B</i>	0,000413	0,027692	-3,20254
<i>ITGA7</i>	0,000782	0,037965	-3,20414
<i>RAB34</i>	0,000115	0,016155	-3,20725
<i>HSPA12B</i>	4,30E-05	0,010342	-3,21003
<i>SLC16A2</i>	0,00108	0,045301	-3,21429
<i>PTRF</i>	4,55E-05	0,010406	-3,22353
<i>MRAS</i>	0,000577	0,033272	-3,24371
<i>MEF2C</i>	0,000221	0,019677	-3,26122
<i>DNAJB5</i>	0,000215	0,019485	-3,26489
<i>TPST1</i>	0,000148	0,016456	-3,2752
<i>TSPAN4</i>	1,05E-05	0,006613	-3,2841
<i>AKT3</i>	0,000715	0,036475	-3,28712
<i>EBF1</i>	0,000106	0,016155	-3,29151
<i>CTSL1</i>	1,49E-05	0,007735	-3,3147
<i>EFHD1</i>	0,000171	0,018086	-3,31524
<i>PRKCDBP</i>	7,41E-05	0,013826	-3,31875

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>RDX</i>	0,000506	0,030733	-3,31925
<i>VIM</i>	5,17E-05	0,011237	-3,33438
<i>CXorf36</i>	9,65E-06	0,006613	-3,33662
<i>DPEP2</i>	0,000627	0,034511	-3,3426
<i>PTGIR</i>	1,30E-05	0,007323	-3,3454
<i>APBB1</i>	0,000491	0,030233	-3,35105
<i>FAM26E</i>	0,00064	0,034867	-3,36009
<i>IRAK3</i>	0,000429	0,02809	-3,3617
<i>EMP3</i>	9,20E-06	0,006613	-3,36881
<i>EFEMP2</i>	5,11E-05	0,011235	-3,37237
<i>CNTNAP1</i>	0,001083	0,04532	-3,37535
<i>MXRA8</i>	0,000616	0,034339	-3,38292
<i>FGFR1</i>	0,000421	0,027858	-3,38846
<i>CCDC88A</i>	0,000189	0,018822	-3,38935
<i>TMEM200B</i>	0,000878	0,040358	-3,39241
<i>MDGA1</i>	0,001253	0,048783	-3,39425
<i>GLIPR2</i>	2,75E-05	0,009043	-3,39872
<i>ARL4C</i>	0,000269	0,02131	-3,40056
<i>ROBO3</i>	0,000139	0,016232	-3,40318
<i>SPARC</i>	0,000605	0,034286	-3,41298
<i>SCHIP1</i>	9,79E-06	0,006613	-3,42331
<i>CD248</i>	0,000177	0,018449	-3,42464
<i>RASGRP3</i>	9,11E-06	0,006613	-3,42562
<i>CLEC2B</i>	0,000103	0,016155	-3,42754
<i>LOC644538</i>	0,000155	0,016922	-3,43157
<i>ITGA5</i>	0,000229	0,019965	-3,43882

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>PCOLCE</i>	0,000228	0,019965	-3,4393
<i>RNF217</i>	0,001215	0,047981	-3,44036
<i>LY96</i>	0,000202	0,018822	-3,44624
<i>TYROBP</i>	0,000417	0,027813	-3,45139
<i>KRBA1</i>	0,000797	0,038232	-3,46348
<i>RASGRP2</i>	0,0013	0,04984	-3,47615
<i>PTGFR</i>	0,001016	0,043361	-3,4841
<i>GUCY1B3</i>	0,000142	0,016232	-3,49606
<i>SCARF2</i>	0,000642	0,034867	-3,51953
<i>RAI14</i>	4,20E-07	0,00237	-3,5256
<i>HHEX</i>	9,88E-06	0,006613	-3,52715
<i>RCN3</i>	1,67E-05	0,007735	-3,54078
<i>SEPT4</i>	8,26E-07	0,002995	-3,55112
<i>RHOJ</i>	2,51E-05	0,008698	-3,55744
<i>ZEB2</i>	0,000326	0,023776	-3,56056
<i>CHST10</i>	0,000207	0,019033	-3,5645
<i>GLI2</i>	0,000729	0,036659	-3,5649
<i>AKR1B1</i>	0,000265	0,021246	-3,56587
<i>ANGPTL2</i>	0,000748	0,037179	-3,57449
<i>RUNX2</i>	1,77E-05	0,007735	-3,57675
<i>ARMCX2</i>	0,000166	0,017683	-3,57733
<i>CA11</i>	3,94E-05	0,010102	-3,57793
<i>THY1</i>	0,000184	0,018569	-3,59405
<i>BCL6B</i>	4,45E-06	0,006085	-3,59578
<i>SCRN1</i>	0,000462	0,029136	-3,60238
<i>TEK</i>	0,000209	0,019047	-3,60435

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>VCAM1</i>	0,000369	0,026123	-3,60674
<i>CYBRD1</i>	0,001064	0,044823	-3,61184
<i>PTHLH</i>	0,000136	0,016232	-3,61592
<i>FLT4</i>	2,70E-05	0,009043	-3,61625
<i>TMOD2</i>	7,43E-05	0,013826	-3,61817
<i>SOAT1</i>	7,39E-06	0,006613	-3,63324
<i>RAB3IL1</i>	3,34E-05	0,00967	-3,63385
<i>ALPK2</i>	0,000257	0,021246	-3,63612
<i>EHD2</i>	7,09E-05	0,013499	-3,64219
<i>COX7A1</i>	9,54E-06	0,006613	-3,65782
<i>DACT3</i>	0,000759	0,03738	-3,66297
<i>ZFPM2</i>	0,00056	0,032721	-3,6647
<i>COL6A2</i>	0,000218	0,019648	-3,67604
<i>STON1</i>	0,001092	0,04556	-3,67846
<i>GULP1</i>	0,000466	0,029136	-3,68077
<i>DFNA5</i>	0,000755	0,037313	-3,68351
<i>CFH</i>	0,000659	0,035188	-3,69975
<i>AMOTL1</i>	0,0012	0,047617	-3,70381
<i>ABCC9</i>	0,001105	0,045896	-3,70728
<i>LPHN2</i>	0,000119	0,016155	-3,72776
<i>NDN</i>	0,000136	0,016232	-3,74454
<i>HERC5</i>	0,000693	0,035772	-3,74553
<i>GGT5</i>	0,00011	0,016155	-3,76727
<i>PPP1R3C</i>	0,001104	0,045896	-3,7747
<i>C6orf174</i>	0,000809	0,038388	-3,78526
<i>CCL3</i>	0,000982	0,042597	-3,78809

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>FAM65B</i>	0,000653	0,035188	-3,79334
<i>SPHK1</i>	0,000837	0,039029	-3,79445
<i>SERPING1</i>	0,000514	0,031068	-3,80648
<i>ADAMTS10</i>	0,000123	0,016155	-3,81613
<i>LAYN</i>	8,17E-05	0,014811	-3,8235
<i>PLCG2</i>	0,00058	0,03331	-3,82589
<i>PALM</i>	0,001161	0,047235	-3,83406
<i>DPYSL3</i>	0,001003	0,043045	-3,84449
<i>TPM2</i>	9,92E-05	0,016155	-3,84639
<i>ARSI</i>	0,000671	0,035414	-3,84714
<i>GYPC</i>	1,64E-05	0,007735	-3,85607
<i>ELMO1</i>	4,15E-05	0,010334	-3,86317
<i>CERCAM</i>	0,000115	0,016155	-3,87483
<i>TSPAN2</i>	0,000645	0,034928	-3,90117
<i>PRRX2</i>	0,000377	0,026311	-3,90237
<i>FGF7</i>	0,000952	0,0422	-3,90604
<i>MRGPRF</i>	0,00098	0,042597	-3,94202
<i>RAB31</i>	0,000306	0,022807	-3,94783
<i>COL15A1</i>	0,000116	0,016155	-3,95596
<i>LOC728264</i>	0,000899	0,040936	-3,95777
<i>MAP7D3</i>	0,000232	0,020121	-3,99121
<i>RERG</i>	0,00094	0,041901	-4,00262
<i>CMAH</i>	0,000392	0,02707	-4,03795
<i>KIAA1383</i>	0,000671	0,035414	-4,06731
<i>MYL9</i>	0,000395	0,027104	-4,06853
<i>TMEM200A</i>	0,000748	0,037179	-4,06905

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>LILRA6</i>	0,000763	0,037445	-4,07687
<i>FBXL2</i>	0,00015	0,016456	-4,08746
<i>GUCY1A3</i>	0,000741	0,037014	-4,08884
<i>GEFT</i>	0,000117	0,016155	-4,14048
<i>GJA5</i>	3,27E-06	0,005536	-4,14894
<i>MEIS1</i>	0,000227	0,019965	-4,15579
<i>SPARCL1</i>	0,000197	0,018822	-4,18092
<i>ST6GALNAC5</i>	0,000843	0,039139	-4,18211
<i>UBE2E2</i>	6,09E-06	0,006444	-4,21286
<i>AEBP1</i>	0,001257	0,048835	-4,22723
<i>SYNC</i>	0,000836	0,039029	-4,23079
<i>LG12</i>	0,000179	0,018449	-4,26162
<i>LOC399959</i>	0,000613	0,034339	-4,26582
<i>VGLL3</i>	0,000632	0,034655	-4,27796
<i>SIRPB1</i>	0,000126	0,01622	-4,2864
<i>CD200</i>	1,05E-05	0,006613	-4,29196
<i>CLDN5</i>	0,000127	0,01622	-4,30783
<i>NPR1</i>	4,53E-05	0,010406	-4,33195
<i>LUM</i>	0,000572	0,033204	-4,33985
<i>KIAA0802</i>	0,000576	0,033272	-4,35094
<i>FLRT2</i>	0,000754	0,037313	-4,3515
<i>EGFL7</i>	1,01E-09	1,71E-05	-4,36474
<i>TNS1</i>	0,000945	0,042008	-4,36596
<i>MSRB3</i>	0,000384	0,026694	-4,37562
<i>JPH2</i>	0,00129	0,049541	-4,38903
<i>C20orf46</i>	0,000801	0,038232	-4,40208

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
SRPX	0,00019	0,018822	-4,41279
PTPLA	4,31E-06	0,006085	-4,4409
STEAP4	0,000261	0,021246	-4,4431
HK3	0,001165	0,047235	-4,46671
AQP1	2,28E-05	0,008224	-4,48139
STMN3	0,000251	0,021221	-4,52375
OLFML2B	0,000118	0,016155	-4,5435
NOX4	0,001004	0,043045	-4,54668
S100A8	0,000696	0,035831	-4,63326
FAM20A	0,000147	0,016451	-4,63753
PHLDB2	4,33E-05	0,010342	-4,65604
BAG2	7,03E-05	0,013499	-4,67627
APLNR	3,04E-06	0,005536	-4,72667
DCN	0,000489	0,030207	-4,74517
EFEMP1	0,001263	0,048971	-4,74969
VEGFC	1,24E-06	0,002995	-4,75498
FCGR2B	0,000906	0,040936	-4,78085
LASS4	0,00035	0,025097	-4,8139
MATK	0,00012	0,016155	-4,8237
BASP1	5,03E-06	0,006085	-4,85083
APOC1	0,000784	0,037965	-4,85622
GLI3	0,000292	0,022057	-4,86512
SIRPA	1,62E-05	0,007735	-4,87177
FGR	2,13E-05	0,008224	-4,88011
MEOX2	0,000409	0,027692	-4,88642
JAM2	0,000131	0,016232	-4,9263

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
CCL2	1,72E-05	0,007735	-4,93094
AOX1	0,000718	0,036475	-4,93223
CRABP2	0,001044	0,044109	-4,9361
CCL14	0,000437	0,02818	-4,94204
AKAP12	0,000816	0,038623	-4,95161
TNFAIP6	0,000266	0,021269	-5,05753
TIE1	9,10E-08	0,000771	-5,08211
ITGAX	5,39E-05	0,011284	-5,08317
CSF3R	0,000434	0,02814	-5,18303
KCNMB4	0,000201	0,018822	-5,21454
KCNMB1	0,000402	0,027435	-5,28777
TAGLN	9,75E-05	0,016044	-5,29839
ADAMTS2	0,000833	0,039029	-5,36078
LMOD1	0,001194	0,047599	-5,38486
MGP	0,000483	0,030075	-5,41355
SLC11A1	8,82E-05	0,015683	-5,44647
MSR1	0,000311	0,023	-5,45545
TREM2	0,000133	0,016232	-5,53676
PI15	0,000262	0,021246	-5,5854
PDLIM3	2,78E-05	0,009043	-5,61449
BGN	0,000127	0,01622	-5,62983
FCN1	0,000435	0,028143	-5,64323
PILRA	4,74E-06	0,006085	-5,75937
RSPO3	0,000241	0,020604	-5,76252
SLIT3	0,000184	0,018569	-5,76421
GFPT2	0,000458	0,029136	-5,76618

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>PYGL</i>	3,34E-05	0,00967	-5,7702
<i>HOPX</i>	5,63E-05	0,011488	-5,77481
<i>AOC3</i>	9,26E-05	0,015683	-5,88348
<i>PLN</i>	0,00069	0,035763	-5,97928
<i>ITGAM</i>	0,000125	0,01622	-5,98222
<i>NTM</i>	0,000143	0,016272	-5,98908
<i>SPEG</i>	0,001041	0,044103	-6,05811
<i>SSC5D</i>	0,000239	0,020593	-6,13222
<i>NXPH3</i>	0,000194	0,018822	-6,15689
<i>CCDC80</i>	0,000206	0,019033	-6,18764
<i>LAMA2</i>	0,000103	0,016155	-6,18818
<i>APOC2</i>	5,42E-05	0,011284	-6,22638
<i>PRODH</i>	0,001146	0,046792	-6,23338
<i>AQP9</i>	0,001268	0,049051	-6,28067
<i>GPNMB</i>	0,000192	0,018822	-6,34622
<i>HAND2</i>	0,000831	0,039029	-6,41694
<i>FCGR3A</i>	0,000122	0,016155	-6,44881
<i>UCHL1</i>	0,000328	0,023857	-6,47169
<i>NINL</i>	0,000257	0,021246	-6,5337
<i>RGMA</i>	0,000285	0,021941	-6,54079
<i>POSTN</i>	0,000263	0,021246	-6,58047
<i>ASPN</i>	0,000377	0,026311	-6,64258
<i>PRRX1</i>	2,22E-05	0,008224	-6,69451
<i>HSPB7</i>	0,000558	0,032693	-7,09927
<i>FN1</i>	0,000362	0,025793	-7,13696
<i>DARC</i>	0,000787	0,037974	-7,28877

Continua.

Continuação da tabela suplementar 2.

Genes	Valor de p	FDR	Fold change
<i>NGFR</i>	0,000105	0,016155	-7,35793
<i>CNN1</i>	0,000412	0,027692	-7,51846
<i>FNDC1</i>	0,000539	0,031898	-7,71009
<i>APOE</i>	5,46E-05	0,011284	-7,92534
<i>PRELP</i>	0,000373	0,026311	-9,07524
<i>MFAP5</i>	0,000159	0,017121	-9,36616
<i>SPOCK1</i>	9,61E-05	0,015958	-9,53008
<i>GAS1</i>	4,67E-05	0,010553	-9,63392
<i>GREM1</i>	5,41E-05	0,011284	-10,2126
<i>FBLN2</i>	7,05E-06	0,006613	-10,3909
<i>SPP1</i>	0,000954	0,0422	-10,9696
<i>CCL18</i>	0,000137	0,016232	-12,5118
<i>CCL21</i>	1,42E-05	0,007735	-17,7636
<i>SFRP2</i>	0,000104	0,016155	-25,7454

Tabela Suplementar 3: Comparação entre os genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de colón com alta e baixa expressão de EGFL7.

Genes	Fold Change High	Fold Change Low
<i>ABCC9</i>	2,567996976	-3,707278227
<i>ADAMTS10</i>	2,189699799	-3,816131946
<i>ALPK2</i>	2,499501883	-3,636118428
<i>ALPL</i>	2,196391864	-2,907988214
<i>APLNR</i>	2,199809868	-4,726672017
<i>APOC1</i>	3,360221829	-4,856219961
<i>APOE</i>	4,15627371	-7,925335894
<i>ARHGEF15</i>	2,096987512	-2,84452286
<i>BASP1</i>	2,227714833	-4,850832701
<i>BCL6B</i>	2,10001935	-3,595779037
<i>BGN</i>	2,765989897	-5,629833107
<i>C1orf162</i>	2,789383348	-3,198403509
<i>CA11</i>	2,133464582	-3,577928592
<i>CCDC88A</i>	2,370707036	-3,389345639
<i>CERCAM</i>	2,70284898	-3,874834439
<i>CHST1</i>	2,450964879	-3,123192631
<i>CLEC1A</i>	2,044519352	-2,407250008
<i>COL15A1</i>	2,424317268	-3,955964114
<i>CRIP2</i>	2,135446948	-2,74603506
<i>CTSL1</i>	2,326720902	-3,314695122
<i>CXorf36</i>	2,020327732	-3,336617871
<i>DFNA5</i>	2,626209498	-3,683509071

Continua.

Continuação da tabela suplementar 3

Genes	Fold Change High	Fold Change Low
<i>DPEP2</i>	2,706161223	-3,342603905
<i>ECSCR</i>	2,044822398	-3,181671375
<i>EGFL7</i>	5,703890477	-4,364738807
<i>ESAM</i>	2,086423813	-2,438609798
<i>FAM20A</i>	3,072473773	-4,637528973
<i>FCGR2B</i>	4,00530532	-4,780851117
<i>FCGR3A</i>	3,145027666	-6,448810083
<i>FGR</i>	2,538321551	-4,880114049
<i>FLT4</i>	2,083506735	-3,616250623
<i>GAMT</i>	2,788028674	-2,782195248
<i>GJA5</i>	2,088993917	-4,148938086
<i>GMFG</i>	2,118072937	-2,480008785
<i>GNB4</i>	2,028645195	-2,860074066
<i>GYPC</i>	2,186925366	-3,856067972
<i>HHEX</i>	2,120096765	-3,527147217
<i>HSD17B14</i>	2,167530372	-2,678508348
<i>HSPA12B</i>	2,043983793	-3,21002847
<i>HTRA1</i>	2,218928053	-2,948455058
<i>HVCN1</i>	2,017696557	-3,031365977
<i>IFI30</i>	2,164810957	-2,850271954
<i>IRAK3</i>	2,191985318	-3,361697427
<i>ITGA5</i>	2,197106038	-3,438823284
<i>ITGAM</i>	3,006811005	-5,982218514
<i>ITGAX</i>	2,742225218	-5,083169188

Continua.

Continuação da tabela suplementar 3

Genes	Fold Change High	Fold Change Low
KCNJ8	2,419569862	-3,10329623
KLHDC8B	2,027561935	-2,542980931
LGALS1	2,416102119	-2,839807084
LY96	2,410095732	-3,446244963
LYL1	2,070680376	-3,155278909
MAPK11	2,818255719	-2,370800008
MATK	3,190454299	-4,823700432
MEOX2	3,051472222	-4,886424506
MSR1	3,013201179	-5,455454012
MYO1F	2,208033147	-2,765173466
NOVA2	2,042659641	-2,278033715
NPR1	2,321916721	-4,331950734
NRP1	2,013517424	-2,744793318
NTNG2	2,190411002	-2,574587123
PDE6B	2,025948953	-2,44627002
PECAM1	2,022091244	-2,722321138
PHLDB2	2,494485394	-4,656042118
PILRA	2,5495184	-5,759374426
PLEKHO1	2,284431349	-2,617275873
PRRX2	2,736794295	-3,902373739
PTRF	2,118814009	-3,223534606
RCN3	2,044111648	-3,540778599
ROBO3	2,152543544	-3,403184568
S100A8	2,807315792	-4,63326124

Continua.

Continuação da tabela suplementar 3

Genes	Fold Change High	Fold Change Low
<i>SH2D3C</i>	2,086386061	-3,075676214
<i>SLC11A1</i>	3,024601701	-5,446471824
<i>SOX17</i>	2,057652982	-2,581251239
<i>SOX18</i>	2,093441033	-2,71654604
<i>SPP1</i>	5,692632876	-10,969635
<i>SSTR2</i>	2,002445989	-2,754914459
<i>ST6GALNAC5</i>	2,808923626	-4,18211368
<i>TGFB1</i>	2,048434482	-2,746821328
<i>TIE1</i>	2,123469974	-5,082111756
<i>TLR2</i>	2,108139086	-2,880842959
<i>TMEM91</i>	2,031499902	-2,000690571
<i>TREM2</i>	3,322077576	-5,536759563
<i>TRPV2</i>	2,104730249	-2,980918692
<i>TYROBP</i>	2,430674203	-3,451386174
<i>UBE2E2</i>	2,25526729	-4,21286086
<i>VEGFC</i>	2,243435014	-4,754977129
<i>VIM</i>	2,214617321	-3,334383431
<i>ZNF467</i>	2,780709668	-2,907311261

Tabela Suplementar 4: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com alta expressão de EGFL7.

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹ D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0001525	Angiogênese	19	<i>NRP1, COL15A1, EGFL7, TIE1, ECSCR, VEGFC, MEOX2, PIK3R6, TYMP, SOX17, FAP, SOX18, GJA5, HOXA3, PECAM1, NRCAM, ADAM8, TNFSF12-TNFSF13, ITGA5</i>	3,79E-07	2,42E-04
GO:0009952	Especificação de padrão anterior / posterior	12	<i>HOXA10, HOXA9, HHEX, HOXA3, HOXC5, HOXC4, HNF1B, HOXC9, HOXC8, HOXC11, HOXC10, HOXC6</i>	3,96E-07	2,42E-04
GO:0050776	Regulação da resposta imunológica	17	<i>CXADR, CD300A, ITGB2, CRTAM, TREM2, ICAM5, LILRB2, OSCAR, FCGR3A, TYROBP, KLRC1, FCGR1A, FCGR2B, HCST, SIGLEC7, CD33, LAIR1</i>	4,00E-07	2,42E-04
GO:0007229	Via de sinalização mediada por integrinas	13	<i>ITGAM, FCER1G, ITGB2, ITGA2B, ADAMTS10, PRAM1, FGR, TYROBP, ITGAX, ITGB8, ADAM8, ITGB6, ITGA5</i>	4,78E-07	2,42E-04
GO:0006954	Resposta inflamatória	23	<i>TGFB1, SLC11A1, ITGB2, C5AR1, LY86, PIK3CD, LY96, FPR3, AIF1, P2RX7, HYAL1, SPP1, TNFRSF8, CHST1, ADAM8, PTX3, CD14, NLRP1, ITGB6, S100A8, HAVCR2, KLRG1, TLR2</i>	5,19E-06	0,00210421
GO:0007165	Transdução de sinais	46	<i>CHRM3, NRP1, COL15A1, PDE1B, C5AR1, GPR85, PIK3CD, FPR3, CXCL14, NRG1, TNFSF13B, LGALS1, RASSF10, CHN2, CHRNE, TNFRSF8, CYTL1, PDE6B, TNFSF12-TNFSF13, FCGR1A, CD33, CD72, UNC5A, BCL11A, CD300A, TIE1, VEGFC, ABCC9, PILRA, LILRB2, MAPK12, POMC, MAPK11, PLCXD3, DOK2, TYROBP, ARHGAP30, PPP1R1A, GNB4, PECAM1, CHRFAM7A, TNFSF8, FCGR2B, FCGR2C, FGF11, TLR2</i>	6,85E-06	0,0023132
GO:0032496	Resposta à lipopolissacarídeos	13	<i>KCNJ8, SLC11A1, C5AR1, MGST1, LY96, IRAK3, LOXL1, P2RX7, TNFRSF8, ALPL, S100A8, TLR2, SNCA</i>	8,79E-05	0,02463924
GO:0007155	Adesão celular	23	<i>FBLN7, COL15A1, EGFL7, ITGAM, CD72, CD300A, ITGB2, ITGA2B, ICAM5, HAPLN4, PARVG, FAP, ITGAX, SPP1, CERCAM, PECAM1, SSPO, ITGB8, ITGB6, ITGA5, CDH16, SIGLEC7, CD33</i>	9,73E-05	0,02463924
GO:0050900	Migração de leucócitos	11	<i>DOK2, ITGAM, CXADR, FCER1G, C5AR1, ITGB2, PECAM1, ITGAX, FPR3, ESAM, ITGA5</i>	1,34E-04	0,03010501
GO:0006955	Resposta imunológica	20	<i>CD86, SLC11A1, C5AR1, LILRB2, PDCD1LG2, CXCL14, CRIP1, TNFSF13B, HLA-DMA, FCGR3A, HRH2, TNFRSF8, TNFSF8, TNFSF12-TNFSF13, FCGR1A, FCGR2B, FCGR1B, FCGR2C, HAMP, TLR2</i>	5,91E-04	0,11328338
GO:0010043	Resposta ao íon zinco	6	<i>P2RX7, SLC30A3, HVCN1, CRIP1, HAMP, S100A8</i>	6,15E-04	0,11328338

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 4

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0034113	Adesão célula-célula heterotípica	5	<i>ITGB2, ITGAX, NRCAM, LILRB2, ITGA5</i>	7,74E-04	0,13062303
GO:0007166	Via de sinalização do receptor da superfície celular	15	<i>NPR1, LY96, LILRB2, PTH1R, LILRB3, MCHR1, P2RX7, DOK2, CLEC1A, TSPAN6, EVL, CD37, CD14, KLRC1, KLRG1</i>	9,73E-04	0,14880486
GO:0009954	Formação de padrão proximal / distal	5	<i>HOXA10, HOXA9, EN1, HOXC11, HOXC10</i>	0,00109004	0,14880486
GO:0043524	Regulação negativa do processo apoptótico do neurônio	10	<i>NTRK1, PRKCG, NRP1, C5AR1, AGAP2, EN1, SIX1, ADAM8, APOE, SNCA</i>	0,00110171	0,14880486
GO:0030198	Organização da matriz extracelular	12	<i>ITGAM, ITGB2, ITGA2B, PECAM1, ITGAX, SPP1, BGN, ITGB8, ITGA5, ITGB6, ICAM5, LOXL1</i>	0,00159747	0,20227994
GO:0009887	Morfogênese de órgãos	8	<i>GAMT, NRP1, CDX1, PAX4, ITGAX, VEGFC, EVL, LY6H</i>	0,00208444	0,24841616
GO:0035050	Desenvolvimento embrionário do tubo do coração	4	<i>HHEX, SOX17, SOX18, GJA5</i>	0,00277381	0,31220764
GO:0001570	Vasculogênese	6	<i>EGFL7, HHEX, TGFB1, SOX17, SOX18, TIE1</i>	0,00454615	0,45969992
GO:0045087	Resposta imunológica inata	18	<i>C1QA, FCER1G, LY86, MATK, PIK3CD, LY96, TREM2, LILRA5, FGR, TYROBP, PTX3, CD14, TNFAIP8L2, NLRP1, S100A8, HAVCR2, KLRG1, TLR2</i>	0,00456511	0,45969992
GO:0034142	Via de sinalização do receptor 4 semelhante a toll	4	<i>ITGAM, ITGB2, LY96, CD14</i>	0,00476491	0,45969992
GO:0007568	Envelhecimento	10	<i>NTRK1, CD86, TGFB1, BCL2A1, SERPINF1, ITGB2, PTH1R, TIMP1, HAMP, SNCA</i>	0,00499696	0,46017416
GO:1904659	Transporte transmembrana de glicose	4	<i>SLC2A12, SLC5A1, SLC2A5, SLC2A6</i>	0,00557785	0,4606754
GO:0045926	Regulação negativa do crescimento	4	<i>MT1A, MT1L, GPC3, ALOX15B</i>	0,00557785	0,4606754

Continua.

¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 4

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0051216	Desenvolvimento de cartilagem	6	<i>HYAL1, HOXA3, ITGB8, HOXC4, TIMP1, BMP5</i>	0,00568454	0,4606754
GO:0042493	Resposta à drogas	14	<i>CD86, NTRK1, EMX1, TGFB1, NNMT, ABCA3, MGST1, PAX4, VEGFC, HNF1B, P2RX7, NAT8, LGALS1, SNCA</i>	0,00665682	0,51872025
GO:0045766	Regulação positiva da angiogênese	8	<i>NTRK1, HYAL1, C5AR1, ITGB2, VEGFC, CHRFAM7A, TNFSF12-TNFSF13, PIK3R6</i>	0,00715792	0,53710944
GO:0006915	Processo apoptótico	21	<i>UNC5A, PDE1B, DAPK2, ITGB2, C5AR1, LY86, ECSCR, SIX1, GDF6, ALOX15B, TIAM1, LGALS1, PRAME, TNFSF8, CD14, NLRP1, TNFSF12-TNFSF13, S100A8, ZNF385A, TLR2, SNCA</i>	0,00763595	0,55251572
GO:0030593	Quimiotaxia de neutrófilos	6	<i>CXADR, FCER1G, C5AR1, ITGB2, PIK3CD, S100A8</i>	0,00909525	0,63541324
GO:0051602	Resposta ao estímulo elétrico	4	<i>NTRK1, P2RX7, CD14, AIF1</i>	0,01084777	0,71936592
GO:0007169	Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana	7	<i>NTRK1, FGR, DOK2, DOK5, FLT4, MATK, PILRA</i>	0,01100708	0,71936592
GO:0071223	Resposta celular ao ácido lipoteicóico	3	<i>TREM2, CD14, TLR2</i>	0,0123609	0,78259964
GO:0006909	Fagocitose	5	<i>SLC11A1, ITGB2, PECAM1, CD14, ICAM5</i>	0,0138758	0,85189016
GO:0045944	Regulação positiva da transcrição do promotor da RNA polimerase II	30	<i>SPI1, AGAP2, SIX1, MEOX2, HOXC11, FSTL3, HOXA10, NHLH2, HHEX, SOX17, SOX18, SIX2, SOHLH2, SIX3, CYTL1, TGFB1, CDX1, BCL11A, SLC11A1, EBF2, EN1, HNF1B, NFATC1, EBF3, POU2F2, BMP5, POMC, MAFB, TNFSF8, TLR2</i>	0,01603809	0,95568156
GO:0001501	Desenvolvimento do sistema esquelético	8	<i>HOXA10, GJA5, EN1, ALPL, PTH1R, HAPLN4, HOXC10, BMP5</i>	0,01758457	0,99508841
GO:0043542	migração de células endoteliais	4	<i>FAP, ITGB2, PECAM1, TNFSF12-TNFSF13</i>	0,01824081	0,99508841

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 4

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0002523	Migração de leucócitos envolvida na resposta inflamatória	3	<i>ITGB2, ADAM8, S100A8</i>	0,0184077	0,99508841
GO:0070374	Regulação positiva da cascata ERK1 e ERK2	9	<i>NTRK1, NRP1, TGFB1, FLT4, TRPV4, C5AR1, TREM2, PLA2G5, HAVCR2</i>	0,021143	0,99508841
GO:0001774	Ativação de células da micróglia	3	<i>AIF1, TLR2, SNCA</i>	0,02180916	0,99508841
GO:0031663	Via de sinalização mediada por lipopolissacarídeos	4	<i>TGFB1, LY96, CD14, TLR2</i>	0,02373132	0,99508841
GO:0050830	Resposta de defesa à bactérias Gram-positivas	6	<i>P2RX7, FGR, C5AR1, TNFSF8, HAVCR2, TLR2</i>	0,02485311	0,99508841
GO:0002250	Resposta imunológica adaptativa	8	<i>CD86, CRTAM, PIK3CD, LILRB2, LILRB3, FCGR1B, LAIR1, HAVCR2</i>	0,02558462	0,99508841
GO:0002755	Via de sinalização do receptor toll-like dependente de MyD88	4	<i>LY96, IRAK3, CD14, TLR2</i>	0,02573845	0,99508841
GO:0001822	Desenvolvimento dos rins	6	<i>KCNJ8, SIX2, SERPINF1, SIX1, HNF1B, FSTL3</i>	0,02598292	0,99508841
GO:0007267	Sinalização célula-célula	11	<i>POMC, CD86, C1QA, NRP1, ITGB2, TNFSF8, LILRB2, SSTR2, CXCL14, FGF11, CD33</i>	0,02701557	0,99508841
GO:0050679	Regulação positiva de proliferação de células endoteliais	5	<i>TGFB1, HYAL1, C5AR1, HTRA1, BMP5</i>	0,02906116	0,99508841
GO:0042102	Regulação positiva de proliferação de células T	5	<i>LILRB2, PDCD1LG2, AIF1, TNFSF13B, HAVCR2</i>	0,02906116	0,99508841
GO:0006911	Fagocitose, envolvimento	4	<i>FCER1G, TREM2, FCGR1A, AIF1</i>	0,03001738	0,99508841
GO:0007160	Adesão célula-matriz	6	<i>TIAM1, PARVG, ITGB2, ITGA2B, ITGB8, ITGB6</i>	0,03082811	0,99508841
GO:0006968	Resp. de defesa celular	5	<i>TYROBP, C5AR1, LY96, LILRB2, KLRG1</i>	0,03227083	0,99508841

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 4

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0016525	Regulação negativa da angiogênese	5	<i>HHEX, NPR1, TIE1, SERPINF1, ECSCR</i>	0,03227083	0,99508841
GO:0060395	Transdução de sinal de proteína SMAD	5	<i>LEFTY1, TGFB1, VIM, GDF6, BMP5</i>	0,03227083	0,99508841
GO:0010628	Regulação positiva de expressão genica	11	<i>P2RX7, MAPK11, TGFB1, NAT8, SLC11A1, TRPV4, ITGB8, PIK3CD, ALOX12B, VIM, TLR2</i>	0,03241068	0,99508841
GO:0034375	Remodelação de partículas de lipoproteína de alta densidade	3	<i>CETP, APOC1, APOE</i>	0,03339753	0,99508841
GO:0007271	Transmissão sináptica, colinérgico	4	<i>CHRM3, CHRNE, CHRFAM7A, APOE</i>	0,034647	0,99508841
GO:0032720	Regulação negativa da produção do fator de necrose tumoral	4	<i>POMC, CHRFAM7A, IRAK3, HAVCR2</i>	0,03709214	0,99508841
GO:0030301	Transporte de colesterol	3	<i>MSR1, CETP, CFTR</i>	0,03768786	0,99508841
GO:0048488	Endocitose de vesícula sináptica	3	<i>SYT5, PACSIN1, SNCA</i>	0,03768786	0,99508841
GO:0042590	Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico exógeno via MHC de classe I	2	<i>FCER1G, IFI30</i>	0,03845224	0,99508841
GO:0061017	Diferenciação de hepatoblastos	2	<i>HHEX, HNF1B</i>	0,03845224	0,99508841
GO:1904479	Regulação negativa de absorção intestinal	2	<i>HAMP, ISX</i>	0,03845224	0,99508841

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 4

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0048866	Especificação do destino das células-tronco	2	<i>SOX17, SOX18</i>	0,03845224	0,99508841
GO:0002062	Diferenciação de condrócitos	4	<i>TGFB1, SIX2, CYTL1, PTH1R</i>	0,03962336	0,99508841
GO:0007409	Axonogênese	6	<i>SPTBN4, NTNG2, LRFN1, SLITRK4, NRCAM, VAX2</i>	0,0421264	0,99508841
GO:0009948	Especificação do eixo Antero / posterior	3	<i>CDX1, SIX2, GPC3</i>	0,04217583	0,99508841
GO:0042789	Transcrição de mRNA do promotor de RNA polimerase II	3	<i>SOX17, SOX18, C5AR1</i>	0,04217583	0,99508841
GO:0021537	Desenvolvimento do telencéfalo	3	<i>SIX3, AVPR1A, NRG1</i>	0,04217583	0,99508841
GO:0048839	Desenvolvimento do ouvido interno	4	<i>TGFB1, SIX1, CYTL1, CXCL14</i>	0,04494117	0,99508841
GO:0001938	Regulação positiva de proliferação de células endoteliais	5	<i>NRP1, EGFL7, FLT4, VEGFC, TNFSF12-TNFSF13</i>	0,04508114	0,99508841
GO:0051092	Regulação positiva da atividade do fator de transcrição NF-kappaB	7	<i>NTRK1, TGFB1, ITGB2, ADAM8, IRAK3, S100A8, TLR2</i>	0,04533371	0,99508841
GO:0007204	Regulação positiva da concentração de íon cálcio citosólico	7	<i>TRPV4, C5AR1, OPRL1, FPR3, PTH1R, AVPR1A, MCHR1</i>	0,04672033	0,99508841
GO:0045807	Regulação positiva da endocitose	3	<i>GPC3, CD14, SNCA</i>	0,04685219	0,99508841
GO:0033280	Resposta à vitamina D	3	<i>TGFB1, SPP1, ALPL</i>	0,04685219	0,99508841

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 4

Código GO	Processo Biológico	nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0097190	Via de sinalização apoptótica	5	<i>P2RX7, LY96, TNFRSF8, CD14, TNFSF12-TNFSF13</i>	0,04919286	0,99508841
GO:0002576	Degranulação de plaquetas	6	<i>SRGN, TGFB1, ITGA2B, PECAM1, VEGFC, TIMP1</i>	0,05030335	0,99508841
GO:0048010	Via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular	5	<i>MAPK11, NRP1, FLT4, VEGFC, MAPK12</i>	0,05132372	0,99508841

Tabela Suplementar 5: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com baixa expressão de EGFL7.

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹ D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0001525	Angiogênese	32	<i>COL18A1, NRP1, ROBO4, RAMP2, COL15A1, CALCRL, ECSCR, THY1, MEOX2, RASIP1, SOX17, SOX18, GJA5, S1PR1, CCL2, EGFL7, MCAM, TIE1, FN1, VEGFC, PLXDC1, FMNL3, MEIS1, EMCN, TAL1, HAND2, MMRN2, PECAM1, ITGA5, TEK, MFGE8, FGFR1</i>	1,09E-16	2,29E-13
GO:0007155	Adesão Celular	34	<i>COL18A1, SRPX, COL15A1, CNTNAP1, CSF3R, ITGAM, LAMA2, TNFAIP6, TGFB11, NTM, THY1, PCDH17, GPNMB, CHST10, ITGAX, SPP1, S1PR1, CCL2, SIRPA, SPOCK1, IGFBP7, CD34, AOC3, POSTN, EGFL7, VCAM1, MCAM, FN1, COL6A2, CERCAM, PECAM1, ITGA7, ITGA5, MFGE8</i>	1,48E-09	1,13E-06
GO:0030198	Organização da Matriz Extracelular	22	<i>COL18A1, POSTN, ITGAM, OLFML2B, VCAM1, SPARC, LAMA2, COL13A1, LUM, PDGFB, BGN, FN1, DCN, MFAP5, CCDC80, COL6A2, ITGAX, SPP1, PECAM1, ITGA7, ITGA5, JAM2</i>	1,62E-09	1,13E-06
GO:0006954	Resposta inflamatória	28	<i>CCL14, PTGFR, TNFAIP6, LY96, TBXA2R, CCL3, SPP1, CCL2, NLRP3, AOX1, TSPAN2, CCL18, TNFRSF4, AOC3, GGT5, NGFR, PTGIR, TGFB1, CCL21, TNFRSF18, SLC11A1, SPHK1, TPST1, ADORA2A, NOX4, CHST1, S100A8, TLR2</i>	5,85E-08	3,06E-05
GO:0070374	Regulação positiva da cascata ERK1 e ERK2	18	<i>PDGFRB, CCL14, NRP1, NDRG4, TGFB1, CCL21, FLT4, PDGFB, TREM2, GPNMB, GLIPR2, HAND2, CCL3, PRKCDPB, CCL2, NOX4, TEK, CCL18</i>	2,49E-07	1,04E-04
GO:0032496	Resposta à lipopolissacarídeos	17	<i>NGFR, PTGFR, PTGIR, VCAM1, SPARC, KCNJ8, TNFRSF18, SLC11A1, LY96, IRAK3, DCN, CYP1A1, PLCG2, ALPL, TNFRSF4, S100A8, TLR2</i>	5,31E-07	1,85E-04
GO:0001570	Vasculogênese	10	<i>RAMP2, EGFL7, HHEX, TGFB1, SOX17, SOX18, TIE1, ZFPM2, QKI, RASIP1</i>	2,82E-06	8,43E-04
GO:0071407	Resposta celular ao composto orgânico cíclico	10	<i>MSR1, P2RY6, TGFB1, LGALS1, RGS19, CYP1A1, CCL3, ALPL, CCL2, GLI2</i>	4,42E-06	0,00115518
GO:0007165	Transdução de sinal	48	<i>NRP1, COL15A1, CNTNAP1, SPARC, CSF3R, TNFAIP6, CRABP2, RASGRP2, RASIP1, SIRPB1, SYDE1, FGF7, LGALS1, AKT3, CHN1, CCL2, SPOCK1, NLRP3, PDE6B, APBB1, CCL18, GABRD, GRASP, CD34, CAP2, PDGFRB, UTS2R, TNFRSF18, STARD8, TIE1, SPHK1, VEGFC, ABCC9, PILRA, GNG11, FAM126A, GULP1, GREM1, MAPK11, TYROBP, GNB4, PECAM1, SPARCL1, ERG, TEK, GNB5, FCGR2B, TLR2</i>	2,24E-05	0,00519512
GO:0007507	Desenvolvimento do coração	15	<i>MEF2C, RAMP2, TGFB1, SPARC, CALCRL, KCNJ8, PDGFB, PKD2, HOPX, GLI3, GLI2, PDLIM3, HAND2, APLNR, TEK</i>	4,42E-05	0,00802804

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0008015	Circulação sanguínea	8	<i>GUCY1A3, UTS2R, GUCY1B3, PLN, ADORA2A, SERPING1, MEOX2, FLI1</i>	4,58E-05	0,00802804
GO:0008360	Regulação da forma celular	13	<i>WIPF1, LST1, RDX, FN1, MSN, FMNL3, FGR, RHOJ, PALM, CCL3, CCL2, ITGA7, PLEKHO1</i>	5,15E-05	0,00802804
GO:0008285	Regulação negativa de proliferação celular	23	<i>RBM38, COL18A1, TGFB1, TGFB1I1, VEGFC, EMP3, SSTR2, PKD2, RERG, PTHLH, GLI3, SFRP2, ADORA2A, GPNMB, TIMP2, NOX4, SPEG, NDN, IGFBP7, SLIT3, SOX7, DFNA5, TLR2</i>	5,21E-05	0,00802804
GO:0014911	Regulação positiva da migração de células musculares lisas	6	<i>PDGFRB, NRP1, POSTN, P2RY6, PDGFB, NOX4</i>	5,38E-05	0,00802804
GO:0007517	Desenvolvimento de órgão muscular	10	<i>SGCE, MEF2C, TAGLN, MRAS, LAMA2, SPEG, FHL3, ITGA7, AEBP1, VAMP5</i>	1,27E-04	0,01767239
GO:0010628	Regulação positiva de expressão genica	17	<i>PTGFR, MEF2C, RAMP2, TGFB1, SLC11A1, RDX, PDGFB, FN1, MSN, QKI, ACTA2, MAPK11, HAND2, CCL3, VIM, CD34, TLR2</i>	1,89E-04	0,02446054
GO:0030819	Regulação positiva do processo Biosintética de cAMP	7	<i>AKAP12, RAMP2, PTGIR, CALCRL, ADORA2A, GPR161, PTHLH</i>	1,99E-04	0,02446054
GO:0035050	Desenvolvimento embrionário de tubo cardíaco	5	<i>NDRG4, HHEX, SOX17, SOX18, GJA5</i>	2,40E-04	0,02788981
GO:0050900	Migração de leucócitos	11	<i>ITGAM, PECAM1, ITGAX, FN1, SIRPA, MSN, ESAM, TEK, ITGA5, CD34, JAM2</i>	3,11E-04	0,02991013
GO:0060216	Hematopoiese definitiva	5	<i>MFAP5, LYL1, MEIS1, TAL1, TEK</i>	3,15E-04	0,02991013
GO:0090280	Regulação positiva da importação de íons de cálcio	5	<i>PDGFRB, TRPV2, PDGFB, CCL3, CCL2</i>	3,15E-04	0,02991013
GO:0006182	Processo Biosintética de cGMP	5	<i>GUCY1A3, GUCY1B3, NPR1, NPR2, AQP1</i>	3,15E-04	0,02991013

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0016525	Regulação negativa da angiogênese	8	<i>HHEX, SPARC, NPR1, TIE1, ECSCR, CCL2, TEK, DCN</i>	3,62E-04	0,03293776
GO:0009611	Resposta à ferida	8	<i>NRP1, FGF7, HHEX, TGFB1, PDGFB, CYP1A1, FN1, CCL2</i>	4,00E-04	0,03486384
GO:0043552	Regulação positiva da atividade de fosfatidilinositol 3-quinase	6	<i>PDGFRB, FGR, TGFB1, CCL21, PDGFB, TEK</i>	4,85E-04	0,04054979
GO:0043547	Regulação positiva da atividade GTPase	26	<i>CCL14, RGS19, PDGFB, THY1, RASGRP2, RASGRP3, FGF7, TBXA2R, CHN1, CCL3, S1PR1, CCL2, DENND5A, CCL18, PDGFRB, PTGIR, PLEKHG2, ARHGEF15, STARD8, ARHGEF17, SH2D3C, RAB31L1, ELMO1, TEK, GNB5, FGFR1</i>	5,77E-04	0,04636406
GO:0030335	Regulação positiva de migração celular	13	<i>PDGFRB, COL18A1, TGFB1, TNFAIP6, MCAM, SPHK1, RDX, PDGFB, FGR, GPNMB, CCL3, S1PR1, ITGA5</i>	6,63E-04	0,05133187
GO:0007010	Organização do citoesqueleto	12	<i>FMNL3, TUBB6, CNTNAP1, HIP1, PALM, CCL3, CCL2, MSN, APOE, THY1, WTIP, CAP2</i>	7,50E-04	0,05601517
GO:0009887	Morfogênese de órgãos	9	<i>GAMT, COL18A1, NPR1, ITGAX, VEGFC, CCL2, SLIT3, DCN, FLI1</i>	8,32E-04	0,05822346
GO:0045766	Regulação positiva de angiogênese	10	<i>GREM1, UTS2R, RAMP2, SFRP2, TBXA2R, SPHK1, VEGFC, TEK, CD34, AQP1</i>	8,61E-04	0,05822346
GO:0050918	Quimiotaxia positiva	6	<i>NRP1, FGF7, GPNMB, PDGFB, CCL3, VEGFC</i>	8,64E-04	0,05822346
GO:0048146	Regulação positiva de proliferação de fibroblastos	7	<i>PDGFRB, UTS2R, TGFB1, SPHK1, PDGFB, FN1, AQP1</i>	0,001039466	0,06789011
GO:0006816	Transporte de íons de cálcio	8	<i>RAMP2, PLN, CALCRL, RAMP3, TRPC1, GJA4, CCL3, PKD2</i>	0,001246186	0,07695546
GO:0001666	Resposta à hipoxia	12	<i>POSTN, RAMP2, TGFB1, VCAM1, CYP1A1, VEGFC, CCL2, NOX4, TEK, WTIP, CYGB, TLR2</i>	0,001288728	0,07695546
GO:0016477	Migração celular	12	<i>FMNL3, PDGFRB, FGR, CCDC88A, TGFB1, SDC2, MATK, ELMO1, S1PR1, CD248, ERG, FGFR1</i>	0,001288728	0,07695546
GO:0035924	Resposta celular ao estímulo do fator de crescimento endotelial vascular	5	<i>NRP1, RAMP2, VCAM1, FLT4, GAS1</i>	0,001359725	0,07893957

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0042060	Cicatrização de feridas	8	<i>PDGFRB, SPARC, SLC11A1, PECAM1, FN1, GLI3, DCN, S100A8</i>	0,001682999	0,09506672
GO:0002040	Brotamento angiogênico	5	<i>NRP1, RAMP2, FLT4, RSPO3, TEK</i>	0,001877643	0,10136032
GO:0050921	Regulação positiva de quimiotaxia	4	<i>PDGFRB, TGFB1, CCL21, PDGFB</i>	0,001891413	0,10136032
GO:0002548	Quimiotaxia de monócitos	6	<i>CCL14, CCL21, PDGFB, CCL3, CCL2, CCL18</i>	0,002000891	0,10454655
GO:0001958	Ossificação endocondral	5	<i>MEF2C, COL13A1, ALPL, TEK, RUNX2</i>	0,002181735	0,11121527
GO:0060326	Quimiotaxia celular	7	<i>CCL14, PDGFRB, VCAM1, CCL21, PDGFB, CCL3, CCL2</i>	0,002727814	0,1357412
GO:0048247	Quimiotaxia de linfócitos	5	<i>CCL14, CCL21, CCL3, CCL2, CCL18</i>	0,002888537	0,14039634
GO:0003151	Morfogênese do trato de saída	6	<i>CLDN5, MEF2C, SFRP2, SOX17, SOX18, GJA5</i>	0,003005852	0,14277798
GO:0001938	Regulação positiva de proliferação de células endoteliais	7	<i>NRP1, EGFL7, FLT4, PDGFB, VEGFC, CCL2, TEK</i>	0,00368507	0,17115103
GO:0007189	Via de sinalização do receptor acoplado à proteína G de ativação da adenilato ciclase	6	<i>PTGFR, PTGIR, CALCRL, ADORA2A, TBXA2R, PTHLH</i>	0,00433215	0,19683029
GO:0030308	Regulação negativa do crescimento celular	9	<i>GREM1, TGFB1, SFRP2, SOX17, NPR1, DACT3, SLIT3, APBB1, RERG</i>	0,0047043	0,20224493
GO:0007519	Desenvolvimento de tecido muscular esquelético	6	<i>MEF2C, HLX, CFL2, MEOX2, VAMP5, DCN</i>	0,004719871	0,20224493
GO:0031663	Via de sinalização mediada por lipopolissacarídeos	5	<i>TGFB1, CCL3, LY96, CCL2, TLR2</i>	0,004741628	0,20224493

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0032331	Regulação negativa de diferenciação de condrócitos	4	<i>GREM1, EFEMP1, PTHLH, GLI2</i>	0,005397324	0,22560816
GO:0030154	Diferenciação celular	20	<i>RBM38, ROBO4, NDRG4, COL15A1, RGS19, HIP1, COL13A1, TGFB111, NOTCH4, TWIST2, ECSCR, MATK, FLI1, FGR, HHEX, CSRP2, HLX, MGP, ERG, VAMP5</i>	0,005560288	0,22786278
GO:0007044	Conjunto de junção célula-substrato	3	<i>FN1, ITGA5, TNS1</i>	0,006564236	0,24944098
GO:0034382	Depuração de remanescentes de quilomícrons	3	<i>APOC2, APOC1, APOE</i>	0,006564236	0,24944098
GO:0003158	Desenvolvimento endotelial	3	<i>GJA5, GJA4, CD34</i>	0,006564236	0,24944098
GO:0061299	Morfogênese da vasculatura da retina em olho tipo câmara	3	<i>NRP1, ARHGEF15, RHOJ</i>	0,006564236	0,24944098
GO:1903779	Regulação da condução cardíaca	6	<i>PLN, FXYD4, NPR1, NPR2, TRPC1, ABCC9</i>	0,007034221	0,26252718
GO:0048469	Maturação celular	5	<i>CCL21, SOX18, LHX6, RUNX2, FGFR1</i>	0,007261134	0,26332682
GO:0043536	Regulação positiva da migração de células endoteliais dos vasos sanguíneos	4	<i>TGFB1, PDGFB, VEGFC, AMOTL1</i>	0,007450231	0,26332682
GO:0019221	Via de sinalização mediada por citocinas	9	<i>NUMBL, CSF3R, FLRT2, BGN, CCL2, IRAK3, IRF5, DCN, ASPN</i>	0,007524903	0,26332682
GO:0045944	Regulação positiva da transcrição do promotor da RNA polimerase II	34	<i>MEOX2, PKD2, GLI3, GLI2, GLIS2, HHEX, SOX17, SOX18, S1PR1, NDN, NLRP3, APBB1, MEF2C, TGFB1, PRRX1, LUM, SLC11A1, EBF1, PBX3, EBF4, MEIS3, FLI1, DCN, RGMA, GREM1, ZEB2, MEIS1, SFRP2, TAL1, HAND2, TCEA2, IRF5, ZFPM2, TLR2</i>	0,007559622	0,26332682

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0050731	Regulação positiva da fosforilação de peptídeo-tirosina	7	<i>NRP1, FGF7, TGFB1, PDGFB, VEGFC, TREM2, ITGA5</i>	0,00853463	0,28732272
GO:0043406	Regulação positiva da atividade da MAP quinase	6	<i>PDGFRB, MEF2C, TGFB1, PDGFB, NOX4, FGFR1</i>	0,008750523	0,28732272
GO:0030097	Hematopoiese	6	<i>TAL1, NOTCH4, PDGFB, CRIP2, CD34, RUNX2</i>	0,008750523	0,28732272
GO:0001568	Desenvolvimento de vasos sanguíneos	5	<i>MEF2C, FOXS1, EGFL7, SPHK1, GJA4</i>	0,008798399	0,28732272
GO:0051694	Capeamento de filamento de actina com extremidade pontiaguda	3	<i>TMOD1, TMOD2, LMOD1</i>	0,009059502	0,29129782
GO:0007267	Sinalização célula-célula	13	<i>NRP1, PTGIR, TNFAIP6, CCL21, SSTR2, PTHLH, GREM1, SFRP2, ADORA2A, GJA4, CCL3, TEK, CCL18</i>	0,009289791	0,29417671
GO:0051897	Regulação positiva da sinalização da proteína quinase B	7	<i>TGFB1, HIP1, CCL21, CCL3, NOX4, TEK, MEIS3</i>	0,00956102	0,2963123
GO:0002062	Diferenciação de condrócitos	5	<i>MEF2C, TGFB1, RUNX2, GLI2, FGFR1</i>	0,009640783	0,2963123
GO:0048844	Morfogênese arterial	4	<i>NRP1, PRRX1, GJA5, APOE</i>	0,009906155	0,29986514
GO:0001947	Aceleração cardíaca	6	<i>MEF2C, NDRG4, SOX17, SOX18, HAND2, PKD2</i>	0,01004333	0,29986514
GO:0009308	Processo metabólico de amina	3	<i>AOC3, VCAM1, CYP1A1</i>	0,011908207	0,34093359
GO:0030828	Regulação positiva do processo Biosintética de cGMP	3	<i>GUCY1A3, NPR1, APOE</i>	0,011908207	0,34093359

Continua.

(*D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0072075	Desenvolvimento do mesênquima metanéfrico	3	<i>PDGFRB, BASP1, PKD2</i>	0,011908207	0,34093359
GO:0008284	Regulação positiva de proliferação celular	19	<i>PDGFRB, CCL14, PTGFR, COL18A1, TGFB1, FLT4, PDGFB, MATK, FN1, VEGFC, CRIP2, PTHLH, RUNX2, GREM1, FGF7, SFRP2, HLX, CD248, FGFR1</i>	0,012665811	0,35772359
GO:0008217	Regulação da pressão arterial	6	<i>GUCY1A3, ACTA2, RAMP2, NPR1, NPR2, CD34</i>	0,013010047	0,35777629
GO:0014068	Regulação positiva da sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase	6	<i>PDGFRB, FGR, PDGFB, TEK, DCN, FGFR1</i>	0,013010047	0,35777629
GO:0030593	Quimiotaxia de neutrófilos	6	<i>CCL14, CSF3R, CCL3, CCL2, CCL18, S100A8</i>	0,013834865	0,37551776
GO:0010977	Regulação negativa do desenvolvimento da projeção neuronal	5	<i>NGFR, LGALS1, DPYSL3, SPOCK1, VIM</i>	0,014633983	0,3921157
GO:0007159	Adesão célula-célula de leucócitos	4	<i>VCAM1, CERCAM, MSN, ITGA5</i>	0,016080179	0,41490832
GO:0033344	Efluxo de colesterol	4	<i>SOAT1, APOC2, APOC1, APOE</i>	0,016080179	0,41490832
GO:0030206	Processo Biosintética de sulfato de condroitina	4	<i>CHST7, CHST12, BGN, DCN</i>	0,016080179	0,41490832
GO:0042552	Mielinização	5	<i>CLDN5, TGFB1, TSPAN2, FAM126A, QKI</i>	0,017013772	0,42841907
GO:0048666	Desenvolvimento de neurônios	5	<i>MEF2C, DPYSL3, PBX3, NDN, GLI2</i>	0,017013772	0,42841907
GO:0018108	Fosforilação de peptídeo-tirosina	9	<i>PDGFRB, FGR, FGF7, EFEMP1, TIE1, FLT4, PDGFB, TEK, FGFR1</i>	0,017984046	0,44746018
GO:0051781	Regulação positiva de divisão celular	5	<i>FGF7, TGFB1, TAL1, PDGFB, VEGFC</i>	0,018288977	0,44969366

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:2000727	Regulação positiva da diferenciação celular do músculo cardíaco	3	<i>GREM1, MEF2C, TGFB1</i>	0,018601222	0,45205295
GO:0048010	Via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular	6	<i>MAPK11, NRP1, FLT4, ELMO1, VEGFC, CCL2</i>	0,019527316	0,46602263
GO:0006909	Fagocitose	5	<i>ADORA2A, SLC11A1, ELMO1, PECAM1, IRF8</i>	0,019622005	0,46602263
GO:0007229	Via de sinalização mediada por integrinas	7	<i>FGR, ITGAM, TYROBP, ITGAX, ITGA7, ITGA5, ADAMTS10</i>	0,020205534	0,4692174
GO:0006469	Regulação negativa da atividade da proteína quinase	7	<i>ADORA2A, FLRT2, GMFG, BGN, THY1, DCN, ASPN</i>	0,020205534	0,4692174
GO:0050729	Regulação positiva de resposta inflamatória	6	<i>CCL14, CCL3, CCL2, CCL18, S100A8, TLR2</i>	0,020604944	0,47323444
GO:0030334	Regulação de migração celular	6	<i>ROBO4, TGFB1, LAMA2, DPYSL3, PECAM1, THY1</i>	0,0217207	0,49049558
GO:0018146	Processo Biosintética de queratam sulfato	4	<i>LUM, CHST1, PRELP, ST3GAL2</i>	0,021846039	0,49049558
GO:0016337	Adesão célula-célula de um único organismo	7	<i>VCAM1, EMCN, COL13A1, ESAM, THY1, CD34, JAM2</i>	0,022060567	0,49049558
GO:0001886	Morfogênese de células endoteliais	3	<i>COL18A1, NOTCH4, PECAM1</i>	0,022414497	0,49311894
GO:0002576	Degranulação de plaquetas	7	<i>TGFB1, SPARC, PDGFB, PECAM1, FN1, VEGFC, SERPING1</i>	0,024027205	0,51858594
GO:0060021	Desenvolvimento de plaquetas	6	<i>CLDN5, MEF2C, PRRX1, HAND2, MEOX2, GLI3</i>	0,024068343	0,51858594

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0001649	Diferenciação de osteoblastos	7	<i>MEF2C, GPNMB, SPP1, CCL3, ALPL, RUNX2, GLI2</i>	0,025053162	0,53429702
GO:0006828	Transporte de íon manganês	3	<i>TRPC6, TRPC1, SLC11A1</i>	0,026519114	0,55424949
GO:0030208	Processo Biosintética de dermatan sulfato	3	<i>CHST12, BGN, DCN</i>	0,026519114	0,55424949
GO:0007568	Envelhecimento	9	<i>TGFB1, VCAM1, TRPC6, KCNMB1, TIMP2, CYP1A1, SERPING1, CCL2, DCN</i>	0,026816226	0,55491002
GO:0050728	Regulação negativa de resposta inflamatória	6	<i>CALCRL, ADORA2A, TNFAIP6, NLRP3, TEK, APOE</i>	0,027886163	0,57139294
GO:0006936	Contração muscular	7	<i>GAMT, TMOD1, ACTA2, TPM2, TMOD2, LMOD1, MYL9</i>	0,028305114	0,57434649
GO:0001501	Desenvolvimento do sistema esquelético	8	<i>POSTN, GJA5, ALPL, PRELP, AEBP1, PTHLH, GLI2, FGFR1</i>	0,029049862	0,57823058
GO:0010629	Regulação negativa de expressão genica	8	<i>MEF2C, TGFB1, SFRP2, HAND2, PDGFB, CCL3, SLIT3, CD34</i>	0,029049862	0,57823058
GO:0043410	Regulação positiva da cascata MAPK	6	<i>NGFR, FLT4, PDGFB, TIMP2, TNFRSF4, FGFR1</i>	0,03063314	0,58488138
GO:0045893	Regulação positiva da transcrição, modelada por DNA	19	<i>MEF2C, TGFB1, TGFB111, NOTCH4, PDGFB, SMARCA1, GLI3, RUNX2, GLI2, GLIS2, LYL1, FGF7, LBH, SOX17, TAL1, SOX18, HAND2, APBB1, SOX7</i>	0,030846542	0,58488138
GO:2000573	Regulação positiva do processo Biosintética do DNA	3	<i>PDGFRB, PDGFB, NOX4</i>	0,030900812	0,58488138
GO:0030239	Conjunto de miofibrilas	3	<i>TMOD1, TMOD2, LMOD1</i>	0,030900812	0,58488138
GO:0046677	Resposta ao antibiótico	4	<i>AOC3, CYP1A1, ALPL, CCL2</i>	0,031063078	0,58488138

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes ¹D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0051480	Regulação da concentração de íon cálcio citosólico	4	<i>PLN, TRPC6, TRPC1, PDE6B</i>	0,031063078	0,58488138
GO:0071356	Resposta celular ao fator de necrose tumoral	7	<i>CCL14, POSTN, VCAM1, CCL21, CCL3, CCL2, CCL18</i>	0,031823895	0,5931181
GO:0006813	Transporte de íons potássio	6	<i>KCNJ8, KCNMB1, GJA5, KCNMB4, ABCC9, AQP1</i>	0,032068108	0,5931181
GO:2001244	Regulação positiva da via de sinalização apoptótica intrínseca	4	<i>PLEKHF1, SEPT4, S100A8, DFNA5</i>	0,033638843	0,61671212
GO:0071346	Resposta celular à interferon-gama	5	<i>CCL14, CCL21, CCL3, CCL2, CCL18</i>	0,034309691	0,6210977
GO:0007275	Desenvolvimento de organismo multicelular	19	<i>TNFRSF18, NOTCH4, PRRX2, TWIST2, EBF1, SSC5D, PCOLCE, EBF4, MEOX2, MFRP, LBH, SFRP2, MRAS, CSRP2, HLX, GPR161, ANGPTL2, ERG, TNFRSF4</i>	0,034472408	0,6210977
GO:0033700	Efluxo de fosfolípidios	3	<i>APOC2, APOC1, APOE</i>	0,035545805	0,62429187
GO:0042311	Vasodilatação	3	<i>KCNJ8, ADORA2A, APOE</i>	0,035545805	0,62429187
GO:2000353	Regulação positiva do processo apoptótico das células endoteliais	3	<i>COL18A1, ECSCR, CD248</i>	0,035545805	0,62429187
GO:0006928	Movimento da célula ou componente subcelular	6	<i>PALM, ELMO1, CERCAM, MSN, VIM, WASF1</i>	0,038223981	0,66573433
GO:0006911	Fagocitose, envolvimento	4	<i>ELMO1, TREM2, MFGE8, GULP1</i>	0,039111883	0,67556888
GO:0048661	Regulação positiva da proliferação de células musculares lisas	5	<i>PDGFRB, CALCRL, PDGFB, S1PR1, AKR1B1</i>	0,040309103	0,69054119

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 5

Código GO	Processo Biológico	Nº de Genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0007264	Transdução de sinal mediada por GTPase pequena	11	<i>ARL4C, REM1, RAB31, MRAS, RGS19, RAB34, RHOJ, SH2D3C, RASGRP2, RERG, RASGRP3</i>	0,041220794	0,69103312
GO:0050714	Regulação positiva da secreção de proteínas	4	<i>TGFB1, ADORA2A, VEGFC, APBB1</i>	0,042007405	0,69103312
GO:0010043	Resposta à íons zinco	4	<i>VCAM1, PLN, HVCN1, S100A8</i>	0,042007405	0,69103312
GO:0048866	Especificação do destino das células-tronco	2	<i>SOX17, SOX18</i>	0,042652283	0,69103312
GO:0061441	Morfogênese de artérias renais	2	<i>NRP1, PKD2</i>	0,042652283	0,69103312
GO:0035759	Adesão célula-matriz mesangial	2	<i>CCL21, CD34</i>	0,042652283	0,69103312
GO:0005976	Processo metabólico de polissacarídeo	2	<i>CHST7, CHST1</i>	0,042652283	0,69103312
GO:0045892	Regulação negativa da transcrição, modelada por DNA	18	<i>TGFB1, RAMP3, PDGFB, TWIST2, LOXL3, GLI3, RUNX2, GLIS2, GREM1, FOXS1, HHEX, SFRP2, SOX18, BASP1, ZFPM2, SOX7, TNFRSF4, BEND5</i>	0,042992257	0,69118321
GO:0007160	Adesão célula-matriz	6	<i>SGCE, OTOA, VCAM1, COL13A1, ITGA7, CD34</i>	0,04505523	0,71080032
GO:0014002	Desenvolvimento de astrócidos	3	<i>TSPAN2, VIM, S100A8</i>	0,045572843	0,71080032
GO:0035855	Desenvolvimento de megacariócitos	3	<i>MEIS1, TAL1, FLI1</i>	0,045572843	0,71080032
GO:0061028	Estabelecimento de barreira endotelial	3	<i>SOX18, RDX, MSN</i>	0,045572843	0,71080032
GO:0072659	Localização da proteína na membrana plasmática	5	<i>EHD2, RAMP2, PLEKHF1, RAMP3, RAB34</i>	0,046866962	0,72557
GO:0030574	Processo catabólico de colágeno	5	<i>COL18A1, ADAMTS2, COL15A1, COL13A1, COL6A2</i>	0,049176819	0,755732

Tabela Suplementar 6: Principais termos enriquecidos na análise de ontologia gênica realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com alta e baixa expressão de EGFL7.

Código GO	Processo Biológico	Nº de genes ¹ D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0001525	Angiogênese	12	<i>NRP1, COL15A1, EGFL7, SOX17, SOX18, TIE1, GJA5, PECAM1, ECSCR, VEGFC, ITGA5, MEOX2</i>	7,25E-09	6,47E-06
GO:0001570	Vasculogênese	6	<i>EGFL7, HHEX, TGFB1, SOX17, SOX18, TIE1</i>	6,42E-06	0,00286615
GO:0035050	Desenvolvimento do tubo cardíaco embrionário	4	<i>HHEX, SOX17, SOX18, GJA5</i>	4,38E-05	0,01303222
GO:0007229	Via de sinalização mediada por integrinas	6	<i>FGR, ITGAM, TYROBP, ITGAX, ITGA5, ADAMTS10</i>	1,03E-04	0,02182067
GO:0032496	Resposta à lipopolissacarídeos	7	<i>KCNJ8, SLC11A1, ALPL, LY96, IRAK3, S100A8, TLR2</i>	1,22E-04	0,02182067
GO:0050731	Regulação positiva da fosforilação de peptídeo-tirosina	5	<i>NRP1, TGFB1, VEGFC, TREM2, ITGA5</i>	6,01E-04	0,08942849
GO:0030198	Organização da matriz extracelular	6	<i>ITGAM, PECAM1, ITGAX, SPP1, BGN, ITGA5</i>	0,00230726	0,23696345
GO:0050900	Migração de leucócitos	5	<i>ITGAM, PECAM1, ITGAX, ESAM, ITGA5</i>	0,00261871	0,23696345
GO:0071407	Resposta celular ao composto cíclico orgânico	4	<i>MSR1, TGFB1, LGALS1, ALPL</i>	0,00269584	0,23696345
GO:0007165	Sinal de transdução	14	<i>NRP1, COL15A1, TIE1, VEGFC, ABCC9, PILRA, MAPK11, TYROBP, LGALS1, GNB4, PECAM1, PDE6B, FCGR2B, TLR2</i>	0,00283273	0,23696345
GO:0016525	Regulação negativa da angiogênese	4	<i>HHEX, NPR1, TIE1, ECSCR</i>	0,00310476	0,23696345
GO:0033280	Resposta à vitamina D	3	<i>TGFB1, SPP1, ALPL</i>	0,00318428	0,23696345

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 6.

Código GO	Processo Biológico	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0001938	Regulação positiva de proliferação de células endoteliais	4	<i>NRP1, EGFL7, FLT4, VEGFC</i>	0,00420116	0,27624607
GO:0048844	Morfogênese arterial	3	<i>NRP1, GJA5, APOE</i>	0,00433085	0,27624607
GO:0048010	Via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular	4	<i>MAPK11, NRP1, FLT4, VEGFC</i>	0,00473423	0,2818446
GO:0007155	Adesão celular	8	<i>COL15A1, EGFL7, ITGAM, PECAM1, ITGAX, SPP1, CERCAM, ITGA5</i>	0,0058095	0,32424257
GO:0006954	Resposta inflamatório	7	<i>TGFB1, SLC11A1, SPP1, CHST1, LY96, S100A8, TLR2</i>	0,00885807	0,42617912
GO:0009887	Morfogênese de órgãos	4	<i>GAMT, NRP1, ITGAX, VEGFC</i>	0,00932245	0,42617912
GO:0048866	Especificação do destino das células-tronco	2	<i>SOX17, SOX18</i>	0,00938739	0,42617912
GO:0031663	Via de sinalização mediada por lipopolissacarídeos	3	<i>TGFB1, LY96, TLR2</i>	0,00989298	0,42617912
GO:0007169	Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana	4	<i>FGR, FLT4, MATK, PILRA</i>	0,01046585	0,42617912
GO:0002755	Via de sinalização do receptor toll-like dependente de MyD88	3	<i>LY96, IRAK3, TLR2</i>	0,01049937	0,42617912
GO:0060312	Regulação da remodelação dos vasos sanguíneos	2	<i>TGFB1, FLT4</i>	0,0140484	0,50180885
GO:0061010	Desenvolvimento da vesícula biliar	2	<i>HHEX, SOX17</i>	0,0140484	0,50180885
GO:0034447	Depuração de partículas de lipoproteína de densidade muito baixa	2	<i>APOC1, APOE</i>	0,0140484	0,50180885
GO:0045087	Resposta imunológica inata	7	<i>FGR, TYROBP, MATK, LY96, TREM2, S100A8, TLR2</i>	0,01574093	0,54064052

Continua.

(*D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 6.

Código GO	Processo Biológico	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0060214	Formação de endocárdio	2	<i>SOX17, SOX18</i>	0,01868776	0,59600599
GO:0032497	Detecção de lipopolissacarídeos	2	<i>LY96, TREM2</i>	0,01868776	0,59600599
GO:0003151	Morfogênese do trato de saída	3	<i>SOX17, SOX18, GJA5</i>	0,01978803	0,6070737
GO:0006468	Fosforilação de proteínas	7	<i>FGR, TGFB1, NPR1, GMFG, MATK, IRAK3, ALPK2</i>	0,02039441	0,6070737
GO:0010936	Regulação negativa da produção de citocinas de macrófagos	2	<i>TGFB1, IRAK3</i>	0,02330556	0,65037079
GO:0060956	Diferenciação de células endocárdicas	2	<i>SOX17, SOX18</i>	0,02330556	0,65037079
GO:0051092	Regulação positiva da atividade do fator de transcrição NF-kappaB	4	<i>TGFB1, IRAK3, S100A8, TLR2</i>	0,02482373	0,67174521
GO:0034382	Depuração de remanescentes de quilomícrons	2	<i>APOC1, APOE</i>	0,02790191	0,71189721
GO:0061299	Morfogênese da vasculatura da retina em olho tipo câmara	2	<i>NRP1, ARHGEF15</i>	0,02790191	0,71189721
GO:0010628	Regulação positiva de expressão genica	5	<i>MAPK11, TGFB1, SLC11A1, VIM, TLR2</i>	0,03502992	0,8479063
GO:0009611	Resposta ao ferimento	3	<i>NRP1, HHEX, TGFB1</i>	0,03547851	0,8479063
GO:0030828	Regulação positiva do processo Biosintética de cGMP	2	<i>NPR1, APOE</i>	0,03703062	0,8479063
GO:0072091	Regulação da proliferação de células-tronco	2	<i>SOX17, SOX18</i>	0,03703062	0,8479063
GO:0010873	Regulação positiva da esterificação do colesterol	2	<i>APOC1, APOE</i>	0,04156319	0,90526651

Continua.

(1D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 6.

Código GO	Processo Biológico	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
GO:0071223	Resposta celular ao ácido lipoteicóico	2	<i>TREM2, TLR2</i>	0,04156319	0,90526651
GO:0016477	Migração celular	4	<i>FGR, CCDC88A, TGFB1, MATK</i>	0,04744919	0,99776536
GO:0070374	Regulação positiva da cascata ERK1 e ERK2	4	<i>NRP1, TGFB1, FLT4, TREM2</i>	0,04950027	0,99776536
GO:0001946	Linfangiogênese	2	<i>SOX18, FLT4</i>	0,05056522	0,99776536

Tabela Suplementar 7: Principais vias enriquecidas na análise no KEEG realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com alta expressão de EGFL7.

Código do KEEG	Vias	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
hsa04380:	Diferenciação de osteoclastos	17	<i>SPI1, TGFB1, PIK3CD, TREM2, NFATC1, LILRB2, LILRB3, MAPK12, LILRA5, OSCAR, MAPK11, FCGR3A, FCGR2A, TYROBP, FCGR1A, FCGR2B, FCGR2C</i>	5,20E-08	1,00E-05
hsa05150:	Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	11	<i>C1QA, HLA-DMA, FCGR3A, ITGAM, FCGR2A, C5AR1, ITGB2, FPR3, FCGR1A, FCGR2B, FCGR2C</i>	3,68E-07	3,55E-05
hsa05140:	Leishmaniose	11	<i>MAPK11, HLA-DMA, FCGR3A, TGFB1, ITGAM, FCGR2A, ITGB2, FCGR1A, FCGR2C, MAPK12, TLR2</i>	5,04E-06	3,24E-04
hsa05152:	Tuberculose	15	<i>TGFB1, ITGAM, FCER1G, ITGB2, MAPK12, MAPK11, HLA-DMA, FCGR3A, FCGR2A, ITGAX, CD14, FCGR1A, FCGR2B, FCGR2C, TLR2</i>	6,20E-05	0,00299363
hsa04145:	Fagossomo	13	<i>MSR1, ITGAM, ITGB2, HLA-DMA, FCGR3A, FCGR2A, CD14, ITGA5, FCGR1A, FCGR2B, FCGR2C, ATP6V1B1, TLR2</i>	1,90E-04	0,00731826
hsa04015:	Via de sinalização RAP-1	15	<i>PRKCG, ITGAM, FLT4, ITGB2, ITGA2B, ADCY4, VEGFC, PIK3CD, MAPK12, MAPK11, TIAM1, PLCB4, RAC3, PLCB2, FGF11</i>	3,79E-04	0,01121533
hsa04750:	Regulação do mediador inflamatório dos canais TRP	10	<i>NTRK1, PRKCG, MAPK11, PLCB4, TRPV4, ADCY4, TRPV2, PIK3CD, PLCB2, MAPK12</i>	4,47E-04	0,01121533
hsa04514:	Moléculas de adesão celular (CAMs)	12	<i>CD86, NTNG2, HLA-DMA, NLGN2, ITGAM, ITGB2, PECAM1, ITGB8, NRCAM, ESAM, PDCD1LG2, LRRC4C</i>	4,65E-04	0,01121533
hsa05146:	Amebíase	10	<i>PRKCG, TGFB1, ITGAM, PLCB4, C8G, ITGB2, PIK3CD, CD14, PLCB2, TLR2</i>	7,95E-04	0,01704345
hsa04971:	Secreção de ácido gástrico	8	<i>PRKCG, CHRM3, PLCB4, HRH2, ADCY4, SSTR2, PLCB2, CFTR</i>	0,001504667	0,02904007
hsa05133:	Coqueluche	8	<i>MAPK11, C1QA, ITGAM, ITGB2, LY96, CD14, ITGA5, MAPK12</i>	0,001762866	0,03093028
hsa05202:	Desregulação transcricional em câncer	11	<i>NTRK1, HOXA10, CD86, LYL1, HHEX, SPI1, ITGAM, BCL2A1, SIX1, CD14, FCGR1A</i>	0,005641943	0,09074125
hsa04650:	Citotoxicidade mediada por células assassinas naturais	9	<i>PRKCG, FCGR3A, TYROBP, FCER1G, ITGB2, RAC3, PIK3CD, NFATC1, HCST</i>	0,007627477	0,11323869

Continua.

(*D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 7.

Código do KEEG	Vias	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
hsa04723:	Sinalização endocanabinoide retrógrada	8	<i>PRKCG, MAPK11, KCNJ5, PLCB4, ADCY4, GNB4, PLCB2, MAPK12</i>	0,009222927	0,12492033
hsa04810:	Regulação do citoesqueleto de actina	12	<i>TIAM1, CHRM3, ITGAM, ITGB2, ITGA2B, ITGAX, ITGB8, RAC3, PIK3CD, ITGA5, ITGB6, FGF11</i>	0,010040097	0,12492033
hsa05142:	Doença de chagas (American trypanosomiasis)	8	<i>MAPK11, C1QA, TGFB1, PLCB4, PIK3CD, PLCB2, MAPK12, TLR2</i>	0,010749967	0,12492033
hsa04611:	Ativação de plaquetas	9	<i>MAPK11, FCGR2A, PLCB4, FCER1G, ITGA2B, ADCY4, PIK3CD, PLCB2, MAPK12</i>	0,011003345	0,12492033
hsa04620:	Via de sinalização do receptor Toll-like	8	<i>CD86, MAPK11, SPP1, LY96, PIK3CD, CD14, MAPK12, TLR2</i>	0,011865293	0,12722231
hsa04726:	Sinapse serotoninérgica	8	<i>PRKCG, KCNJ5, PLCB4, KCND2, GNB4, ALOX12B, PLCB2, ALOX15B</i>	0,015016954	0,15254064
hsa04640:	Linhagem de células hematopoiéticas	7	<i>ITGAM, ITGA2B, CD37, CD14, ITGA5, FCGR1A, CD33</i>	0,015910531	0,15353663
hsa05323:	Artrite reumatoide	7	<i>CD86, HLA-DMA, TGFB1, ITGB2, TNFSF13B, TLR2, ATP6V1B1</i>	0,016754316	0,15398014
hsa04670:	Migração transendotelial de leucócitos	8	<i>PRKCG, MAPK11, ITGAM, ITGB2, PECAM1, PIK3CD, ESAM, MAPK12</i>	0,017936995	0,15735636
hsa04972:	hsa04972: Secreção pancreática	7	<i>PRKCG, CHRM3, PLCB4, ADCY4, PLA2G5, PLCB2, CFTR</i>	0,021438844	0,1728764
hsa04071:	Via de sinalização esfingolipídica	8	<i>PRKCG, MAPK11, PLCB4, FCER1G, RAC3, PIK3CD, PLCB2, MAPK12</i>	0,022123278	0,1728764
hsa04510:	Adesão focal	11	<i>PRKCG, PARVG, FLT4, ITGA2B, SPP1, ITGB8, VEGFC, RAC3, PIK3CD, ITGA5, ITGB6</i>	0,022393316	0,1728764
hsa05144:	Malária	5	<i>TGFB1, GYPC, ITGB2, PECAM1, TLR2</i>	0,02708161	0,20102887
hsa05416:	Miocardite viral	5	<i>CD86, HLA-DMA, CXADR, ITGB2, RAC3</i>	0,043799343	0,30924064
hsa04725:	Sinapse colinérgica	7	<i>PRKCG, CHRM3, PLCB4, ADCY4, GNB4, PIK3CD, PLCB2</i>	0,045393185	0,30924064
hsa05414:	Cardiomiopatia dilatada	6	<i>TGFB1, ITGA2B, ADCY4, ITGB8, ITGA5, ITGB6</i>	0,046466211	0,30924064

Continua.

(1D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 7.

Código do KEEG	Vias	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
hsa04724	Sinapse glutamatérgica	7	<i>PRKCG, PLCB4, HOMER2, ADCY4, GNB4, PLCB2, SHANK1</i>	0,050548096	0,32519275
hsa04370:	Via de sinalização VEGF	5	<i>PRKCG, MAPK11, RAC3, PIK3CD, MAPK12</i>	0,053914626	0,33566203

Tabela Suplementar 8: Principais vias enriquecidas na análise no KEEG realizada a partir dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com baixa expressão de EGFL7.

Código do KEEG	Vias	Nº de genes ¹ D.E	Genes	Valor de p	FDR
hsa04270:	Contração do músculo liso vascular	13	<i>GUCY1A3, GUCY1B3, PTGIR, RAMP2, CALCRL, RAMP3, NPR1, NPR2, ACTA2, ADORA2A, KCNMB1, KCNMB4, MYL9</i>	2,37E-05	0,00439092
hsa05205:	Proteoglicanos em câncer	16	<i>TGFB1, LUM, SDC2, RDX, TWIST2, HSPB2, FN1, MSN, DCN, MAPK11, MRAS, AKT3, PLCG2, ITGA5, FGFR1, TLR2</i>	9,48E-05	0,00876992
hsa04014:	Via de sinalização Ras	16	<i>PDGFRB, NGFR, FLT4, PDGFB, VEGFC, RASGRP2, GNG11, RASGRP3, FGF7, MRAS, AKT3, GNB4, PLCG2, TEK, GNB5, FGFR1</i>	3,65E-04	0,01695906
hsa04670:	Migração transendotelial de leucócitos	11	<i>MAPK11, CLDN5, VCAM1, ITGAM, PECAM1, PLCG2, MSN, ESAM, THY1, MYL9, JAM2</i>	4,51E-04	0,01695906
hsa04810:	Regulação do citoesqueleto de actina	15	<i>PDGFRB, ITGAM, RDX, PDGFB, FN1, MSN, FGF7, MRAS, CFL2, ITGAX, ITGA7, ITGA5, WASF1, MYL9, FGFR1</i>	5,50E-04	0,01695906
hsa04015:	Via de sinalização RAP-1	15	<i>PDGFRB, NGFR, ITGAM, FLT4, PDGFB, VEGFC, RASGRP2, RASGRP3, MAPK11, FGF7, MRAS, ADORA2A, AKT3, TEK, FGFR1</i>	5,50E-04	0,01695906
hsa04151:	Via de sinalização PI3K/AKT	20	<i>PDGFRB, NGFR, CSF3R, LAMA2, FLT4, PDGFB, FN1, VEGFC, GNG11, FGF7, COL6A2, AKT3, SPP1, GNB4, ITGA7, TEK, GNB5, ITGA5, FGFR1, TLR2</i>	6,54E-04	0,01727619
hsa05144:	Malária	7	<i>TGFB1, VCAM1, GYPC, SDC2, PECAM1, CCL2, TLR2</i>	0,00110186	0,02548043
hsa04380:	Diferenciação de osteoclastos	11	<i>LILRA6, MAPK11, FCGR3A, TGFB1, TYROBP, AKT3, PLCG2, SIRPA, TREM2, FCGR2B, SIRPB1</i>	0,0012498	0,02569029
hsa04022:	Via de sinalização cGMP-PKG	12	<i>GUCY1A3, GUCY1B3, MEF2C, PLN, TRPC6, KCNJB8, NPR1, NPR2, KCNMB1, AKT3, KCNMB4, MYL9</i>	0,00153024	0,02830944
hsa05133:	Coqueluche	8	<i>MAPK11, ITGAM, CFL2, IRF8, NLRP3, SERPING1, LY96, ITGA5</i>	0,00217272	0,03654111
hsa04062:	Via de sinalização de quimiocinas	12	<i>CCL14, FGR, CCL21, AKT3, GNB4, ELMO1, CCL3, CCL2, GNB5, CCL18, RASGRP2, GNG11</i>	0,00542857	0,08369049
hsa04514:	Moléculas de Adesão celular (CAMs)	10	<i>CLDN5, NTNG2, CNTNAP1, VCAM1, ITGAM, SDC2, PECAM1, ESAM, CD34, JAM2</i>	0,00747915	0,10643404
hsa04510:	Adesão focal	12	<i>PDGFRB, LAMA2, FLT4, COL6A2, AKT3, PDGFB, SPP1, FN1, VEGFC, ITGA7, ITGA5, MYL9</i>	0,01135644	0,1500672

Continua.

(¹D.E: Diferencialmente expressos)

Continuação da tabela suplementar 8.

Código do KEEG	Vias	Nº de genes 1D.E	Genes	Valor de p	FDR
hsa05200:	Vias no câncer	18	<i>PDGFRB, TGFB1, CSF3R, LAMA2, PDGFB, FN1, VEGFC, RASGRP2, GNG11, GLI3, GLI2, RASGRP3, FGF7, AKT3, GNB4, PLCG2, GNB5, FGFR1</i>	0,01431938	0,17660566
hsa05202:	Desregulação transcricional em câncer	10	<i>LYL1, NGFR, MEF2C, MEIS1, HHEX, ITGAM, PBX3, ERG, FLI1, RUNX2</i>	0,02008123	0,23218922
hsa04611:	Ativação plaquetária	8	<i>GUCY1A3, MAPK11, GUCY1B3, PTGIR, TBXA2R, AKT3, PLCG2, RASGRP2</i>	0,03841919	0,41809119
hsa04620:	Via de sinalização do receptor Toll-like	7	<i>MAPK11, AKT3, SPP1, CCL3, LY96, IRF5, TLR2</i>	0,04364392	0,44856252

Tabela Suplementar 9: Estimativa de infiltrados imunes nas lesões acometidas no lado direito nos pacientes com alta expressão de EGFL7 vs. expressão normal.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
TIMER	Células B	0,10037906	0,02318071	0,10289122	0,069268918	0,871
TIMER	Células T CD4+	0,11719079	0,04586787	0,11679153	0,09940584	0,718
TIMER	Células T CD8+	0,19512475	0,01399585	0,20907134	0,084659992	0,775
TIMER	Neutrófilos	0,1050159	0,00378037	0,11438031	0,060074301	0,957
TIMER	Macrófagos	0,06076962	0,0591691	0,08096859	0,108920814	0,224
TIMER	Célula dendrítica mieloide	0,47316607	0,07668069	0,4680617	0,172936321	0,278
CIBERSORT	Células B naive	0,04729401	0,01318632	0,05356314	0,043269794	0,859
CIBERSORT	Células B de memória	0,00584939	0,01432801	0,00648052	0,016795438	0,992
CIBERSORT	Células B de plasma	0,01401621	0,03331401	0,04671513	0,060185827	0,175
CIBERSORT	Células T CD8+	0,05373373	0,03761397	0,05727973	0,0617034	0,942
CIBERSORT	Células T CD4+ naive	0,00116904	0,00286356	0,00080556	0,007521218	0,969
CIBERSORT	Células T CD4+ de memória em repouso	0,16494079	0,04773408	0,18291668	0,081699154	0,161
CIBERSORT	Células T CD4+ de memória ativas	0,01320667	0,02476906	0,01124672	0,026659487	0,558
CIBERSORT	Células T helper folicular	0,04850685	0,03806992	0,06808765	0,048339407	0,779

Continua

****P>0.05**

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
CIBERSORT	Células NK em repouso	0,05223132	0,01800005	0,05945306	0,033250446	0,006**
CIBERSORT	Células NK ativas	0,00496996	0,00557809	0,00699559	0,014478921	0,742
CIBERSORT	Monócitos	0,00951167	0,01025595	0,01291003	0,018581717	0,54
CIBERSORT	Macrófagos M0	0,24204821	0,11771746	0,16835772	0,123780971	0,12
CIBERSORT	Macrófagos M1	0,07953988	0,06148427	0,05244591	0,0446256	0,324
CIBERSORT	Macrófagos M2	0,17731952	0,06377143	0,15199797	0,094849587	0,583
CIBERSORT	Células dendrítica mieloide em repouso	0,00077297	0,00119949	0,00189465	0,003891883	0,44
CIBERSORT	Célula dendrítica mieloide ativas	0,00440083	0,01038907	0,0075853	0,01373565	0,942
CIBERSORT	Monócitos ativos	0,00450213	0,01076447	0,02082709	0,034106736	0,043**
CIBERSORT	Monócitos em repouso	0,02508859	0,0315392	0,03658972	0,047550784	0,632
CIBERSORT	Eosinófilos	0	0	0,00083432	0,003294463	0,525
CIBERSORT	Neutrófilos	0,01014992	0,01584797	0,00641752	0,017497925	0,25
CIBERSORT-ABS	Células B naive	0,01263806	0,01323577	0,01545054	0,020765795	0,752
CIBERSORT-ABS	Células B de memória	0,00471907	0,01155931	0,00348021	0,012155811	0,544
CIBERSORT-ABS	Células B de plasma	0,00115793	0,00264709	0,0126546	0,020975186	0,000021**

Continua

**P>0.05

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
CIBERSORT-ABS	Células T CD8+	0,01565059	0,01735071	0,01866183	0,029081909	0,852
CIBERSORT-ABS	Células T CD4+ naive	9,3408E-05	0,0002288	0,0005115	0,004998526	0,822
CIBERSORT-ABS	Células T CD4+ de memória em repouso	0,04987956	0,05065977	0,04685523	0,032029924	0,971
CIBERSORT-ABS	Células T CD4+ de memória ativas	0,00524308	0,00886677	0,0028926	0,007037555	0,74
CIBERSORT-ABS	Células T helper folicular	0,02063553	0,02907645	0,01997238	0,023984158	0,556
CIBERSORT-ABS	Células T reguladoras (Tregs)	0,01031971	0,00887076	0,01231049	0,011474004	0,381
CIBERSORT-ABS	Células NK em repouso	0,01556339	0,01560361	0,01600882	0,015815063	0,498
CIBERSORT-ABS	Células NK ativas	0,00078994	0,0009623	0,00149156	0,002844867	0,415
CIBERSORT-ABS	Monócitos	0,00452048	0,0085835	0,00369378	0,006626345	0,54
CIBERSORT-ABS	Macrófagos M0	0,05248239	0,03408897	0,04127171	0,042730662	0,175
CIBERSORT-ABS	Macrófagos M1	0,02670925	0,02685484	0,01761541	0,023803396	0,114
CIBERSORT-ABS	Macrófagos M2	0,05563548	0,06470504	0,05046946	0,051682843	0,395
CIBERSORT-ABS	Célula dendrítica mieloide em repouso	0,00020245	0,00034792	0,00050318	0,00123115	0,494
CIBERSORT-ABS	Célula dendrítica mieloide ativas	0,00035401	0,00082913	0,00155698	0,003330744	0,58

Continua

**P>0.05

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
CIBERSORT-ABS	Monócitos ativos	0,00090448	0,00200885	0,0083021	0,013891527	0,001**
CIBERSORT-ABS	Monócitos em repouso	0,00294534	0,00399033	0,00628314	0,008142428	0,444
CIBERSORT-ABS	Eosinófilos	0	0	0,00012058	0,000454146	0,505
CIBERSORT-ABS	Neutrófilos	0,00089162	0,0013813	0,00174168	0,004786838	0,913
QUANTISEQ	Células B	0,01582911	0,02347702	0,01591834	0,013008606	0,986
QUANTISEQ	Macrófagos M1	0,07150859	0,02987316	0,05627447	0,028527475	0,178
QUANTISEQ	Macrófagos M2	0,05479556	0,01843864	0,04208675	0,055750794	0,567
QUANTISEQ	Neutrófilos	0,10064808	0,01624632	0,11378895	0,06113669	0,589
QUANTISEQ	Células NK	0,02949304	0,01554101	0,02470411	0,011581373	0,298
QUANTISEQ	Células T CD4+ (Não reguladoras)	0,00855467	0,01322401	0,02088079	0,032089866	0,334
QUANTISEQ	Células T CD8+	0,01135836	0,01562299	0,00793422	0,017626943	0,626
QUANTISEQ	Células T reguladoras (Tregs)	0,0490867	0,05751649	0,03765012	0,028277745	0,627
QUANTISEQ	Células dendríticas mieloides	0,00056937	0,00139467	0,0015114	0,006831049	0,729
QUANTISEQ	Célula não caracterizada	0,65815652	0,12083341	0,67925085	0,145020408	0,715
XCELL	Células dendríticas mieloides ativas	0,10552121	0,11721147	0,11119463	0,107022122	0,116

Continua

**P>0.05

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
XCELL	Células B	0,03142724	0,04900132	0,02906011	0,059875274	0,878
XCELL	Células T CD4+ de memória	0,0004903	0,00120098	0,00036321	0,001539432	0,587
XCELL	Células T CD4+ naive	0,0170319	0,04171946	0,00715123	0,019296671	0,554
XCELL	Células T CD4+ (Não reguladoras)	0,0015637	0,00188702	0,00060836	0,001787966	0,392
XCELL	Células T CD4+ de memória central	0,00122042	0,0029894	0,00116315	0,00426485	0,624
XCELL	Células T CD4+ de memória efetora	8,4761E-19	1,4306E-18	0,00121297	0,003862825	0,43
XCELL	Células T CD8+ naive	0,00028424	0,00045298	0,00243614	0,003006718	0,161
XCELL	Células T CD8+	0,01775274	0,02410678	0,01470537	0,025017807	0,776
XCELL	Células T CD8+ de memória central	0,01557628	0,01746929	0,008908	0,019859299	0,488
XCELL	Células T CD8+ de memória efetora	0,00727147	0,01194032	0,00247986	0,010333096	0,509
XCELL	Células B de memória comutada por classe	0,01523507	0,02578424	0,01702655	0,024270552	0,908
XCELL	Progenitor linfoide comum	0,0265622	0,01876977	0,02342823	0,017384952	0,89

Continua

**P>0.05

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
XCELL	Progenitor mielóide comum	1,4128E-18	2,0583E-18	0,0001873	0,001095599	0,668
XCELL	Células dendríticas mielóides	0,00545298	0,00920254	0,00597493	0,009006159	0,515
XCELL	Células endoteliais	0,01234786	0,02817101	0,0246625	0,027646764	0,793
XCELL	Eosinófilo	1,2052E-05	2,9521E-05	0,00172945	0,004249854	0,000117**
XCELL	Fibroblastos associados ao câncer	0,06945013	0,10322793	0,05519022	0,087504143	0,874
XCELL	Progenitor de granulócito-monócito	1,6703E-18	1,6932E-18	0,00118451	0,005335859	0,577
XCELL	Célula-tronco hematopoiética	0,05357285	0,09121231	0,0810038	0,070066567	0,771
XCELL	Macrófagos	0,01744476	0,02983122	0,01391958	0,02036312	0,26
XCELL	Macrófagos M1	0,01185928	0,01631074	0,0174252	0,020533348	0,382
XCELL	Macrófagos M2	0,01268156	0,01856987	0,00638619	0,010940073	0,127
XCELL	Mastócito	0,00054777	0,00134176	0,00317213	0,003638474	0,451
XCELL	Células B de memória	0,00175911	0,00351419	0,00602508	0,018827411	0,483
XCELL	Monócitos	0,00632825	0,01396519	0,00396996	0,010990229	0,31
XCELL	Células B naive	0,00250799	0,00316497	0,00272087	0,007662844	0,556
XCELL	Neutrófilos	2,2424E-19	2,7429E-19	0,0020947	0,004151235	0,001**

Continua

**P>0.05

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
XCELL	Células NK	0,00175389	0,00429614	0,0003419	0,002128176	0,313
XCELL	Células T NK	0,00983719	0,01089593	0,02027716	0,020873476	0,996
XCELL	Célula dendrítica plasmocitocítica	0,00376799	0,00922964	0,00641817	0,012277415	0,74
XCELL	Células B de plasma	0,00238182	0,00165645	0,01878075	0,010232536	0,897
XCELL	Células T gama-delta	0	0	0,0009194	0,002799671	0,409
XCELL	Células T CD4+ Th1	0,13355859	0,07787699	0,08526117	0,058053085	0,081
XCELL	Células T CD4+ Th2	0,04836536	0,03232916	0,05987603	0,05105131	0,099
XCELL	Células T reguladoras (Tregs)	8,5975E-19	1,2911E-18	0,00030703	0,001547926	0,618
XCELL	Score imunológico	0,0548556	0,07600307	0,05038433	0,071955884	0,358
XCELL	Score de estroma	0,05896784	0,10893697	0,04360189	0,064012945	0,666
XCELL	Score de microambiente	0,11382344	0,17198274	0,09398621	0,107388814	0,575
EPIC	Células B	0,00267563	0,00231938	0,0063744	0,008639963	0,249
EPIC	Fibroblastos associados ao câncer	0,25097744	0,25805944	0,17450052	0,191594679	0,314
EPIC	Células T CD4+	0,05839389	0,03068985	0,06390907	0,026323334	0,592
EPIC	Células T CD8+	0,0108133	0,00815671	0,01736523	0,011813476	0,187

Continua

**P>0.05

Continuação da tabela suplementar 9.

Algoritmo	Tipo celular	Alta expressão de EGFL7		Expressão normal de EGFL7		Valor de p
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
EPIC	Células endoteliais	0,07043792	0,08157538	0,06601005	0,046534448	0,888
EPIC	Macrófagos	0,00981897	0,00943435	0,00511562	0,004987045	0,25
EPIC	Células NK	1,8446E-07	2,7457E-07	6,005E-05	0,000367677	0,683
EPIC	Células não caracterizadas	0,59688266	0,30552801	0,66666505	0,196047881	0,368
MCPCOUNTER	Células T	93,8295476	87,2350723	74,093366	51,55952596	0,583
MCPCOUNTER	Células T CD8+	82,8087833	79,6331236	80,4156505	106,3570944	0,943
MCPCOUNTER	Score citotóxico	79,7851738	66,2918691	60,6646898	80,52818203	0,551
MCPCOUNTER	Células NK	29,4097417	37,3274326	18,4982661	30,46095235	0,368
MCPCOUNTER	Células B	100,065138	210,41085	101,539115	168,8681208	0,983
MCPCOUNTER	Monócitos	493,958743	538,90715	304,742563	272,3268067	0,403
MCPCOUNTER	Macrófagos/Monócitos	493,958743	538,90715	304,742563	272,3268067	0,403
MCPCOUNTER	Células dendríticas mieloides	53,54324	74,7800619	51,4533866	52,59903809	0,921
MCPCOUNTER	Neutrófilos	213,595613	73,4634802	318,062668	267,4246159	0,326
MCPCOUNTER	Células endoteliais	382,806842	378,56862	366,318993	199,7345287	0,914
MCPCOUNTER	Fibroblastos associados ao câncer	18223,5594	17721,7596	15035,5726	18841,05667	0,671

**P>0.05

Parecer do Comitê de Ética

Os experimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos sob o número CAAE: 33719420.3.0000.5437, protocolo 1955/2020.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão de EGFL7 em câncer colorretal

Pesquisador: Lucas Tadeu Bidinotto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33719420.3.0000.5437

Instituição Proponente: SISTEMA MED SERVICOS EDUCACIONAIS S.A.

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.864.362

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1190428.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 21/07/2021).

Resumo:

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais frequente em homens e o segundo em mulheres no Brasil, com pico incidência em torno dos 70 anos de idade e sobrevida em 5 anos variando entre 50% a 65%. Seu mecanismo molecular está bem estabelecido, com alterações mais comuns nos genes APC, KRAS e TP53. Estudos apontam o gene EGFL7 como importante no controle da angiogênese e crescimento de neoplasias, incluindo o CCR. No entanto, a utilização de parsatuzumab (anti-EGFL7) não mostrou resultados animadores em ensaio clínico randomizado de fase II em CCR. Portanto, o mecanismo do gene EGFL7 deve ser melhor estudado para que sejam propostos protocolos mais eficazes. Este projeto tem como objetivo avaliar o potencial prognóstico de EGFL7 em CCR, bem como caracterizar sua expressão em linhagens celulares deste tipo tumoral, gerando base para futuros estudos funcionais. Serão realizadas análises in silico com os dados de CCR do The Cancer Genome Atlas (TCGA), onde será correlacionado o padrão de metilação, números de cópias e expressão de EGFL7 em uma análise integrada. Adicionalmente, a

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 4.864.362

expressão deste gene será correlacionada com a expressão dos outros genes avaliados em RNASeq do TCGA, com objetivo de encontrar genes coexpressos. A expressão proteica será avaliada através de imunohistoquímica em tissue microarray de CCR, com 487 pacientes, e o padrão de marcação será correlacionado com dados clinicopatológicos e moleculares dos pacientes do Hospital de Braga de Portugal. Por fim, a expressão de EGFL7 será caracterizada em 11 linhagens celulares comerciais de CCR através de western blot e qRT-PCR.

Hipótese:

A hipótese do presente projeto é que a expressão de EGFL7 possui um potencial prognóstico em CCR e que este gene atua através da via das MAP -quinases, podendo ser alvo de estudos futuros.

Metodologia Proposta:

Trata-se de um estudo de coorte, com tamanho amostral por conveniência. Para as análises in silico, será feito o download de dados de expressão, aCGH e metilação publicados e disponíveis pelo TCGA (The Cancer Genome Atlas – estima-se aproximadamente 1300 amostras). Considerando os pacientes do Hospital de Braga de Portugal, serão utilizados os tissue microarrays (TMAs) já cortados e sob posse do pesquisador principal (Lucas Tadeu Bidinotto), estimando-se o total de aproximadamente 487 pacientes com diagnóstico de Câncer Colorretal. Nas análises in silico, os pacientes que tiverem o valor de expressão de EGFL7 pelo menos 20% acima da mediana serão considerados positivos, e os que tiverem o valor pelo menos 20% abaixo da mediana serão considerados negativos. Os dados clinicopatológicos serão utilizados para a separação dos pacientes por tipo tumoral e para construção de curvas de sobrevivência. Nas análises de imunohistoquímica de EGFL7 em pacientes do Hospital de Braga de Portugal, a positividade para a expressão dos genes será avaliada através de scores de intensidade e extensão da reação. A extensão será medida com escores 0 (negativo), 1 (25% de células positivas), 2 (25-50% de células positivas) ou 3 (mais de 50% de células positivas). A intensidade, por sua vez, será avaliada como 0 (negativo), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte). A soma destes parâmetros resultará em scores entre 0 e 6: os pacientes com escores entre 0 e 3 serão considerados como "expressão fraca" e os com scores entre 4 e 6 serão considerados como "expressão forte". Os dados clinicopatológicos dos pacientes (idade, gênero, apresentação clínica, localização do tumor, aparência macroscópica, CEA, tamanho tumoral, tipo histológico, diferenciação, TNM, tratamento, seguimento e status do paciente) e moleculares (mutação em BRAF e KRAS – através de sequenciamento direto – SANGER - , e instabilidade de microssatélites - MSI) os dados já foram

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

Continuação do Parecer: 4.864.362

coletados no Hospital de Braga, e estão sob custódia da investigadora principal de Portugal (Sandra Martins), que realizará a análise estatística. Por fim, para a caracterização da expressão de EGFL7 em linhagens celulares comerciais de câncer colorretal, as linhagens celulares (SW620, SW480, CO115, HCT15, HT29, SK-CO-10, Caco-2, DLD1, LOVO, DIFI, COLO 320HSR) serão cultivadas em meio de cultura adequado e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C até as células crescerem e se tornarem aderentes e confluentes, quando serão tripsinizadas e repicadas na proporção 1:4. Após expansão das linhagens (3 ciclos de repique), serão extraídos proteína e RNA total, de acordo com protocolo padrão do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (3 réplicas técnicas e 3 réplicas experimentais). Para extração de proteína, as células serão raspadas e coletadas em tampão de lise, e um coquetel inibidor de protease. O lisado celular será mantido em gelo por 1 hora e centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, e o total de proteínas será quantificado utilizando o método de Bradford. Em seguida, as proteínas serão semi-quantificadas utilizando a técnica de Western blot, de acordo com o protocolo já descrito por nós em (40). Para extração de RNA total, utilizaremos o método de Trizol, com modificações padrão do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular. 500ng de RNA total de alta qualidade será utilizado para síntese de cDNA utilizando Superscript III reverse transcriptase kit (Thermo Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. A expressão do mRNA de cada gene será avaliada através de qRT-PCR, utilizando SYBR Green Master Mix kit (Thermo Scientific). Será utilizado, como housekeeping gene o HPRT1.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente projeto tem como objetivo avaliar o potencial prognóstico da proteína EGFL7 em uma série de câncer colorretal, bem como caracterizar a expressão desta proteína em linhagens celulares deste tipo tumoral.

Objetivo Secundário:

- Avaliar in silico o padrão de metilação e de números de cópias do gene EGFL7 na base de dados do TCGA e correlacionar com a expressão;
- Avaliar in silico a expressão de EGFL7 em uma grande série de câncer colorretal da base de dados do TCGA (The Cancer Genome Atlas) e correlacionar com sobrevida;
- Correlacionar in silico a expressão de EGFL7 e de outros genes importantes na gênese do câncer colorretal;

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

Continuação do Parecer: 4.864.362

- Avaliar através de imunohistoquímica a expressão de EGFL7 em uma casuística de câncer colorretal humano e correlacionar com suas características clinicopatológicas e moleculares;
- Caracterizar a expressão de EGFL7 em linhagens de câncer colorretal, a fim de gerar base para futuros estudos funcionais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores:

Riscos:

Considerando que o presente projeto visa utilizar amostras que já foram coletadas no projeto intitulado "Expressão de Marcadores de Metabolismo e de Angiolinfangiogenese no Cancro Colorectal – associação com características clinicopatológicas e impacto no prognóstico" e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Braga de Portugal (série já publicada em Martins et al. 2016 - doi 10.1186/s12885-016-2566-9), não entraremos em contato novamente com os pacientes. Porém o estudo apresenta o risco mínimo de quebra accidental de sigilo dos dados clinicopatológicos dos mesmos. Para evitar ao máximo, o banco de dados ficará apenas na posse da pesquisadora Sandra Martins, que realizará todas as análises estatísticas.

Benefícios:

Apesar dos pacientes deste estudo provavelmente não serem beneficiados com este projeto de pesquisa, seus resultados podem levar a avanços no entendimento das bases moleculares do câncer colorretal, que pode beneficiar pacientes futuros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

RESPOSTAS REFERENTES ÀS PENDÊNCIAS EMITIDAS NO PARECER N° 4.352.854, submetidos pelo CEP em 21 de Outubro de 2020.

PENDÊNCIA 1: No documento "PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1190428.pdf", pagina 5 de 7, o pesquisador propõe dispensa de TCLE, com a seguinte justificativa: "O presente projeto visa utilizar amostras de trabalho já realizado, publicado em BMC Cancer. 2016 Jul 26;16:535. doi: 10.1186/s12885-016-2566-9, intitulado "Significance of glycolytic metabolismrelated protein expression in colorectal cancer, lymph node and hepatic metastasis", cuja aprovação pelo Comitê de Ética já ocorreu. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido."

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	
Bairro: Dr. Paulo Prata	CEP: 14.784-400
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 4.864.362

Entretanto, na referida publicação, página 2 de 15, lê-se: "Tissue samples and data from 487 patients treated in Hospital de Braga, Portugal, between 1st January of 2005 and 1st January of 2010 with CRC diagnosis were collected prospectively." Solicitam-se esclarecimentos sobre a origem das amostras, se do Hospital de Câncer de Barretos ou do Hospital de Braga. I. Caso a origem das amostras seja do Hospital de Câncer de Barretos, o pesquisador deve incluir na Plataforma Brasil Parecer Consubstanciado de aprovação pelo Sistema CEP/CONEP do protocolo de pesquisa referente a coleta do material especificado, bem como TCLE aplicado, comprovando a anuência do participante para que os dados coletados possam ser utilizados em outras pesquisas. II. Caso a origem das amostras seja do Hospital de Braga, apresentar documento de aprovação para a realização do presente projeto, pelo Comitê de Ética da instituição de origem, ou seja, Hospital de Braga, Portugal. A dispensa da aplicação do TCLE também deve ser solicitada à instituição em que as amostras foram coletadas e o termo de consentimento aplicado. - RESPOSTA PESQUISADOR: Segue em anexo a aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Braga (protocolo 32/2013) (documento "Comissao_de_Etica_de_Braga.pdf). - ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. (O documento apresentado não contém as informações solicitadas, ou seja: "Caso a origem das amostras seja do Hospital de Braga, apresentar documento de aprovação PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE PROJETO pelo Comitê de Ética da instituição de origem, ou seja, Hospital de Braga, Portugal. A DISPENSA DA APLICAÇÃO DO TCLE também deve ser solicitada à instituição em que as amostras foram coletadas e o termo de consentimento aplicado". O documento apresentado refere-se a parecer institucional para a realização de projeto intitulado: "Expressão de marcadores de metabolism e de angiogênese no cancro colorectal – associação com as características clinicopatológicas e impacto no prognóstico" o qual não contempla o projeto submetido para a apreciação.)

RESPOSTA PESQUISADOR: O racional do presente projeto de pesquisa está dentro do "guarda-chuva" do projeto anteriormente aprovado pelo CEP do Hospital de Braga, pois visa o estudo de marcador de angiogênese (EGFL7) em câncer colorretal. Em adição à aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Braga (protocolo 32/2013) (documento "Comissao_de_Etica_de_Braga.pdf), segue carta do Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho, da instituição origem das amostras, declarando a assinatura de todos pacientes do projeto em questão, explicando a impossibilidade de novo consentimento, e se responsabilizando pelo projeto e pela dispensa do TCLE, o que é normal de se fazer nas instituições portuguesas (documento "Declaracao_Adhemar.pdf").

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 4.864.362

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 4: De acordo com os documentos apresentados, diferentes instituições são referenciadas: no documento "ProjetoDetalhado.pdf", há a indicação de que o projeto foi apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral e Aplicada da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP); no documento "Folharosto.pdf" há a indicação do Sistema Med de Serviços Educacionais (FACISB); já no documento "ProjetoDetalhado.pdf" descreve a participação do Hospital de Câncer de Barretos e Hospital de Portugal, neste sentido solicitam-se esclarecimentos sobre qual a contribuição de cada uma das instituições envolvidas, além da indicação das instituições na Plataforma Brasil - RESPOSTA PESQUISADOR: A aluna (Cristiane de Oliveira) é discente do Programa de PósGraduação em Patologia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), campus de Botucatu, o qual o pesquisador principal (Lucas Tadeu Bidinotto) é docente e orientador. Ademais, o pesquisador principal é celetista pelo Sistema Med de Serviços Educacionais (FACISB), instituição vinculada à solicitação de bolsa de Mestrado para a Fundação de Amparo em Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para a aluna. Por fim, o pesquisador principal é Pesquisador Voluntário da Fundação Pio XII, onde os experimentos de imunohistoquímica e cultura celular ocorrerão. A participação do Hospital de Braga será cedendo as amostras (lâminas de tissue microarrays) e o banco de dados. - ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. (O pesquisador apresenta justificativas para a indicação das instituições descritas no projeto, entretanto, não houve a inclusão das instituições na plataforma Brasil. Neste sentido, solicita-se adequação.)

RESPOSTA PESQUISADOR: O presente projeto de pesquisa será executado apenas na Fundação Pio XII (cadastrada como co-participante no estudo) e o orientador é celetista pela FACISB (Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata - Sistema Med Serviços Educacionais, cadastrada como instituição proponente). Não ocorrerá qualquer intervenção ou experimento que envolva a Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), e a bolsa de Mestrado solicitada à FAPESP foi indeferida. Portanto, a única instituição co-participante do estudo é a Fundação Pio XII, onde atualmente estão as amostras, que foi devidamente incluída na Plataforma Brasil.

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 6: No documento "PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1190428.pdf", no

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400
Bairro: Dr. Paulo Prata	
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 4.864.362

desenho, resumo e corpo de texto do projeto aparecem as frases: “Considerando os pacientes do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) e parceiros, serão utilizados os tissue microarrays (TMAs) já cortados, estimando-se o total de aproximadamente 450 pacientes”; “Nas análises de imunohistoquímica de EGFL7 em pacientes do Hospital de Amor e parceiros” e “Nas análises de imunohistoquímica de EGFL7 em pacientes do Hospital de Amor e parceiros”. Entretanto, no tópico RISCOS (destaque nosso) do mesmo documento, o pesquisador descreve “Considerando que o presente projeto visa utilizar amostras que já foram coletadas em outro projeto e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Braga (Portugal - série já publicada em Martins et al. 2016 - doi 10.1186/s12885-016-2566-9.), não entraremos em contato novamente com os pacientes”. Solicitam-se esclarecimentos sobre a real procedência das amostras e a adequação do texto apresentado. - RESPOSTA PESQUISADOR: De fato, houve um erro nas informações contidas no documento. Os dados já foram coletados no Hospital de Braga, e lâminas dos TMAs estão sob posse do pesquisador principal (Lucas Tadeu Bidinotto). Não entraremos novamente em contato com os pacientes. O texto foi adequado. (correções podem ser encontradas no documento “ProjetoPesquisa_pendencia.pdf” na página 7, em highlight amarelo, além do documento “TERMO_DE_TRANSFERENCIA_DE_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf”). - ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. (O pesquisador fez as alterações referente a procedência das amostras, entretanto, não apresentou documento de dispensa do TCLE emitido pela instituição de origem das amostras. Neste sentido, solicita-se esclarecimentos. Além disso, o pesquisador alterou o número de amostras solicitadas no projeto inicial, passando de 450 para 487 amostras. Neste sentido, solicita-se esclarecimentos e o envio de justificativa para a inclusão das novas amostras.).

RESPOSTA PESQUISADOR: Em adição à aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Braga (protocolo 32/2013) (documento “Comissao_de_Etica_de_Braga.pdf”), segue carta do Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho, da instituição origem das amostras, declarando a assinatura de todos os pacientes do projeto em questão, explicando a impossibilidade de novo consentimento, e se responsabilizando pelo projeto e pela dispensa do TCLE, o que é normal de se fazer nas instituições portuguesas (documento “Declaracao_Adhemar.pdf”). No texto inicial, a estimativa do número de pacientes era 450; no entanto, após as informações mais acuradas que no banco de dados havia 487 dos pacientes, fizemos a adequação no texto. Considerando que o projeto anteriormente enviado (que propunha “aproximadamente 450 pacientes”) ainda não foi aprovado pelo CEP, decidimos por alterar o número para aprovação inicial, para não necessitar o envio de um adendo.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII



Continuação do Parecer: 4.864.362

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Amor de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta -se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 23/01/2022.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1955/2020.

OBSERVAÇÃO: Devido a Lei da Biodiversidade (Lei 13.123/15) tornou-se obrigatório o cadastro de todas as pesquisas que de alguma forma tiveram acesso ao patrimônio genético brasileiro e/ou conhecimento tradicional associado, na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen (<https://sisgen.gov.br/paginas/login.aspx>).

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

Continuação do Parecer: 4.864.362

Quais atividades deverão ser cadastradas?

I - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado dentro do país realizado por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;

II - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado por pessoa jurídica sediada no exterior associada a instituição nacional de pesquisa científica e tecnológica, pública ou privada;

III - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado realizado no exterior por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;

IV - remessa de amostra de patrimônio genético brasileiro para o exterior com a finalidade de acesso, nas hipóteses II e III;

V - envio de amostra que contenha patrimônio genético brasileiro por pessoa jurídica nacional, pública ou privada, para prestação de serviços no exterior como parte de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico.

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo “relatório” para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional nº001/13, item XI.2.d.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1190428.pdf	21/07/2021 08:46:48		Aceito
Folha de Rosto	2021_rosto.pdf	21/07/2021 08:46:18	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito
Outros	Declaracao_Adhemar.pdf	20/07/2021 09:54:08	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	20210720_Projeto.pdf	20/07/2021 09:53:45	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito
Outros	2021CartaResposta_Pendencia.pdf	20/07/2021 09:51:45	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito
Outros	Comissao_de_Etica_de_Braga.pdf	28/07/2020 18:33:00	CRISTIANE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	TERMO_DE_TRANSFERENCIA_DE_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	28/07/2020 18:32:34	CRISTIANE DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e	dec_cienc_lucasbidinotto.pdf	28/05/2020 14:23:35	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII



Continuação do Parecer: 4.864.362

Infraestrutura	dec_cienc_lucasbidinotto.pdf	28/05/2020 14:23:35	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade.pdf	14/05/2020 12:14:14	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamento.pdf	14/05/2020 12:13:35	Lucas Tadeu Bidinotto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 23 de Julho de 2021

Assinado por:
Thiago Buosi Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP **Município:** BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br