

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 29/01/2021.



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

Iael Weissberg Minutentag

**Identificação de Alterações no Transcritoma
Associadas à Progressão Metastática em
Adenocarcinoma de Reto**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestra em Bases Gerais da
Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra A. Drigo Linde
Coorientador: Prof. Dr. Fábio A. Marchi

**Botucatu
(2019)**

Iael Weissberg Minutentag

**Identificação de Alterações no Transcritoma Associadas à
Progressão Metastática em Adenocarcinoma de Reto**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra
em Bases Gerais da Cirurgia

Orientadora: Profa.Dra. Sandra Drigo Linde
Coorientador: Prof.Dr. Fábio A. Marchi

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Minutentag, Iael Weissberg.

Identificação de alterações no transcrito associadas à progressão metastática em adenocarcinoma de reto / Iael Weissberg Minutentag. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Sandra Aparecida Drigo Linde

Coorientador: Fabio Albuquerque Marchi

Capes: 20000006

1. Reto - Doenças. 2. Adenocarcinoma. 3. Metástase. 4. Células imunocompetentes.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de reto; Metástase; Perfil imune; Progressão tumoral.

DEDICATÓRIA

Aos pacientes, que aceitaram contribuir para esse estudo, fornecendo os seus dados e amostras, sem eles esse trabalho não teria sido possível.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação, todas as minhas professoras e professores de ciências e biologia que despertaram meu fascínio por entender como o mundo funciona.

À minha mãe que sempre respondeu todos os meus “porquês”, que me criou minha paixão pela leitura todas as noites antes de dormir, que é minha amiga e companheira em todos os momentos, que nunca duvidou do meu potencial e sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos.

À minha segunda mãe, minha vó, baba que lia todas as placas da rua quando saíamos para passear de carro, e sempre tem um provérbio ou conselho quando eu preciso e que nunca entende porque eu fico nervosa antes de uma apresentação afinal “você conhece o conteúdo não tem motivo pra ficar nervosa”.

Ao meu pai que sempre ofereceu o melhor conselho “Ficar triste ou nervosa não vai resolver seus problemas, levante e vai encontrar uma solução” e está sempre disposto a me ouvir reclamar simplesmente porque estou precisando.

Ao meu tio Daniel que pouco a pouco, sem que eu percebesse, me ensinou filosofia e pensamento científico, através de conversas e discussões que na época me pareciam confusas e só mais tarde fui entender a importância.

À minha tia Nancy que estava sempre disposta a me fazer contemplar novas possibilidades e caminhos

E por fim, dedico esse trabalho ao meu avô Marcos, que apesar de não estar mais entre nós, foi uma das pessoas que me inspirou a seguir na pesquisa em oncologia molecular para tentar melhorar a vida dos pacientes de câncer e encontrar novas soluções em terapia e diagnóstico.

AGRADECIMENTO

À minha orientadora, Dra. Sandra A. Drigo Linde, pela dedicação, incentivo, organização, apoio, e suporte incondicional na realização desse trabalho. Por me tranquilizar quando parecia que nada ia dar certo. Por sempre fazer tudo prezando pela qualidade. E por ter me proporcionado aprendizado que vai além do laboratório.

Ao meu co-orientador, Dr. Fabio Marchi, que me apresentou ao mundo da bioinformática e pela ajuda, sugestões e incentivos inestimáveis durante a realização desse trabalho.

À Dra. Patrícia Reis, pela ajuda, pelos conselhos e ideias preciosas.

Ao Dr. Marcio de Carvalho, técnico do laboratório que sempre vai além de todas as expectativas e não mede esforços para nos ajudar a realizar nossos experimentos.

À Dra. Silvia Rogatto que nos socorreu quando parecia que não haveria como concluir esse estudo, sem sua ajuda não teríamos conseguido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida e à Faculdade de Medicina de Botucatu e Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), pela estrutura disponibilizada para a concretização desse trabalho

Aos meus amigos do laboratório NeoGene, Ana Laura Seneda, Carolina Fázio Campos, Cadu, Marco Lopez, Nátalia Bertoni, Tainara Félix, Tatiane Basso e que participaram junto comigo do passo a passo da realização desse estudo.

Ao Hospital de Câncer de Barretos, em especial ao Dr. Rui Reis, Dr. Cristiano de Pádua e as incríveis equipes do Biobanco e Comitê de Ética pela contribuição e apoio a esse estudo.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial ao patologista Marcelo Padovani pela colaboração, dedicação e paciência para revisar todas as lâminas utilizadas nessa pesquisa.

Aos meus melhores amigos Vitor Aurélio e Michelle Paz com quem sempre tenho as melhores conversas e debates seja sobre ciência, política ou qualquer outro tema do universo, e estão sempre dispostos a me ajudar a organizar minhas ideias, por mais confusas que elas possam parecer.

A todos os funcionários da Biblioteca e Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial a Márcia Fonseca Piagentini Cruz secretária do programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia.

A todos que contribuíram muito ou pouco para a realização desse trabalho

Muito Obrigada!

*“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma
grande beleza”.*

Marie Curie

RESUMO

Introdução: Apesar dos avanços no tratamento, cerca da metade dos pacientes com câncer de reto (CR) desenvolverá metástase à distância. No entanto, as vias biológicas envolvidas na progressão do câncer não são totalmente conhecidas. Neste estudo, investigamos os perfis moleculares e imunológicos em adenocarcinomas de reto relacionados à progressão metastática visando identificar biomarcadores moleculares e/ou alvos terapêuticos.

Pacientes e Métodos: O transcrito de 15 tecidos de CR metastático (M) e não-metastático (NM) pré-tratamento e de duas amostras de tecido de reto normais foi avaliado utilizando a plataforma Clariom D. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando a alteração de expressão era maior que 2 vezes e o valor de $p < 0,05$ e detectados com o pacote limma. As funções moleculares e vias biológicas foram determinadas com a ferramenta *Enricher*. Os achados foram validados utilizando dados do TCGA e o perfil imunológico determinado com o algoritmo xCell.

Resultados: A comparação entre os grupos M e NM revelou 52 genes diferencialmente expressos, sendo 27 regulados positivamente e 25 regulados negativamente. O gene *ANLN* foi detectado com o maior valor de *fold change* nos tumores metastáticos. Além disso, expressão aumentada de *ANLN* foi associada com menor sobrevida em pacientes com CR. A via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi detectada como alterada nos tumores M. Validação dos resultados com dados do TCGA confirmou o gene *ANLN* como associado aos tumores do grupo M. Além disso, os genes *KIF14*, *XRCC2* e *GPX3*, que possuem importantes funções na carcinogênese, também foram detectados. As populações de células imunes infiltrantes identificadas como mais significativas nos tumores M foram células dendríticas plasmocitóides (pDC), T-helper 2 (Th2) acompanhadas de diminuição das células T reguladoras (Treg), que podem desempenhar um papel na evasão imune do câncer, favorecendo a progressão da doença.

Conclusões: Os perfis transcriptômico e imunológico aqui identificados revelaram potenciais marcadores moleculares e alvos para terapia que podem ser úteis para a medicina de precisão em pacientes com adenocarcinomas de reto.

Palavras-Chave: Adenocarcinoma de Reto, Progressão Tumoral, Células Imunes, Metástase.

ABSTRACT

Introduction: Despite advances in treatment, about half of patients with rectal cancer (RC) will develop distant metastasis. However, the biological pathways underpinning the cancer progression are not fully understood. In this study, we sought to identify molecular and immunological profiles in rectal adenocarcinomas related to metastatic progression aiming to identify molecular biomarkers and/or therapeutic targets.

Patients and Methods: Transcriptome analysis of 15 pre-treatment metastatic (M) and non-metastatic (NM) rectal cancer tissues and two normal rectal tissue samples was evaluated using Clariom D platform. Genes were considered differentially expressed when presenting 2-fold change and $p < 0.05$ and were obtained with *limma* package. Molecular function and biological pathways with the *Enricher* package. Our findings were validated from the TCGA database and the immunological profile was determined using the xCell algorithm.

Results: The comparison of M with NM groups revealed 52 differentially expressed genes, being 27 up-regulated and 25 down-regulated. *ANLN* gene was detected as the top gene upregulated in M tumours. Additionally, *ANLN* overexpression was associated with shorter survival in RC patients. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway was detected as altered in M tumours. Cross-study validation with TCGA dataset confirmed *ANLN* gene as associated with M tumours. Furthermore, *KIF14*, *XRCC2* and *GPX3* genes, which have important carcinogenesis functions, were also detected. The most significant infiltrating immune cell populations in M tumours were plasmacytoid dendritic cells (pDCc), T-helper 2 (Th2) that together with diminishment of T regulatory (Treg) cells, can play a role in cancer immune evasion leading to disease progression.

Conclusions: The transcriptomic and immunological profiles identified here revealed potential molecular markers and targets for therapy which can be useful for precision medicine in patients with rectal adenocarcinomas.

Keywords: Rectal Adenocarcinoma, Tumour Progression, Transcriptome, Immune Profile, Metastasis

Lista de Abreviaturas e Siglas

AJCC - American Joint Committee on Cancer

ANLN - anillin actin binding protein

APC - APC, WNT signaling pathway regulator

BAX - BCL2 associated X, apoptosis regulator

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

CCR – Câncer colorretal

CDKN2 - cyclin dependent kinase inhibitor 2A

CIMP - CpG Island Methylator Phenotype

CIN – *Chromosomal Instability*

CMS – *Consensus Molecular Subtype*

CR – Câncer de Reto

CTNNB1 - catenin beta 1

DNA - *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

E2F4 - E2F transcription factor 4

FBXW7 - F-box and WD repeat domain containing 7

FC – *Fold Change*

FDA – *Food and Drug Administration*

FDR – False Discovery Rate

GO – *Gene Ontology*

GPX3 - glutathione peroxidase 3

GSEA - Gene Set Enrichment Analysis

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

IGFR2 - Fc fragment of IgG receptor IIa

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IVLP – Invasão Vascular Linfática e Perineural

KIF14 - kinesin family member 14

KRAS - KRAS proto-oncogene, GTPase

LOH – *Loss of Heterozigoses*

MGMT - O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

MLH1 - mutL homolog 1

MMR-D – Mismatch Repair Deficiency

MSI - Microsatellite Instability

MSI-H ou MSI + - Microsatellite Instability High

MSS - Microsatellite Stability

OMS – Organização Mundial de Saúde

PIK3CA - phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PMS2 - PMS1 homolog 2, mismatch repair system component

POLE - DNA polymerase epsilon, catalytic subunit

RC- Rectal Cancer

RNA – Ribonucleic Acid, Acido Ribonucleico

RNA-seq – RNA sequencing

SCNV – Somatic Copy Number Variation

SMAD4 - SMAD family member 4

ssGSEA – single sample Gene Set Enrichment Analysis

TAC – Transcriptome Analysis Console

TCF7L2 - transcription factor 7 like 2

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TEM – Transição Epitélio Mesenquima

TGFB2 - transforming growth factor beta receptor 2

TME – Tumour Microenvironment

TNM – Tumor, Nódulo, Metástase

TP53 - Tumor Protein p53

VEGF - vascular endothelial growth factor

XRCC2 - X-ray repair cross complementing 2

Lista de Símbolos

$\geq$ - Maior ou igual a

$\leq$ - Menor ou igual a

$>$ - Maior que

$<$ - Menor que

α – Alfa

β – Beta

γ - Gama

TM - Trade Mark

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA	8
INTRODUÇÃO	9
OBJETIVO GERAL	21
Objetivos Específicos.....	21
PACIENTES E MÉTODOS	22
CAPÍTULO I	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO II	61
MANUSCRIPT DRAFT	63
Transcriptome profiling reveals potential biomarkers and immune escape mechanisms associated with metastatic progression in rectal adenocarcinoma.....	63
ABSTRACT	64
INTRODUCTION.....	65
PATIENTS AND METHODS	66
RESULTS	69
DISCUSSION.....	71
REFERENCES	Erro! Indicador não definido.

REVISÃO DA LITERATURA

INTRODUÇÃO

Epidemiologia e Fatores de Risco

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor mais comum na população mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) são previstos 1.849.528 novos casos de CCR em todo o mundo em 2018 (FERLAY et al., 2018; NG et al., 2013). O câncer de cólon representa aproximadamente 2/3 dos casos registrados, sendo mais comum em mulheres enquanto o câncer de reto representa um terço dos casos e é mais comum em homens. Foi notada também uma incidência oito vezes maior em pacientes brancos quando comparados a pacientes negros para ambos os sítios tumorais (LEE et al., 2013; TAMAS et al., 2015). Foi também observado um aumento na incidência de CCR em pacientes jovens, particularmente em países ocidentais, devido a razões ainda em grande parte desconhecidas (DENG, 2017).

Cerca de 20% dos pacientes apresentam doença metastática ao diagnóstico (RIIHIMÄKI et al., 2016). No mundo, CCR é a segunda causa de morte por câncer em números absolutos, com aproximadamente 880.792 mil mortes em 2018 (FERLAY et al., 2018; NG et al., 2013). O CCR é considerado um dos marcadores mais claros de transição econômica em países ocidentais. Na última década houve um aumento da incidência e da mortalidade em países com médio a alto índice de desenvolvimento humano (IDH), particularmente na Europa Ocidental, Ásia e América do Sul (ARNOLD et al., 2017).

No Brasil estima-se que em 2018 ocorrerão 36.360 casos de CCR, sendo 17.380 casos em homens e 18.980 em mulheres. Na região sudeste, com exceção dos tumores de pele não melanoma, o CCR é o segundo mais frequente tanto em homens quanto em mulheres (INCA, 2017). Além disso, o Brasil foi o país em que foi detectado o maior aumento na incidência de CCR na população masculina em todo o mundo (ARNOLD et al., 2017).

Apesar do câncer de cólon e de reto serem considerados entidades diferentes no que se refere à epidemiologia, localização anatômica, origem embrionária, evolução clínica, estratégia de tratamentos e mesmo aspectos

moleculares, a maioria dos estudos tende a avaliá-los conjuntamente (TAMAS et al., 2015).

Já foi mostrado que a etiologia do câncer de reto é diferente dos outros tumores do intestino grosso, os tumores de reto e colón distais estão mais relacionados com a ingestão de água proveniente de fontes poluídas, alcoolismo e tabagismo (CHEN et al., 2005; DENG, 2017). Já os tumores de colón proximal e transversal estão mais fortemente relacionados com dieta ricas em gorduras e alimentos de origem animal, sedentarismo e obesidade (DENG, 2017; TAMAS et al., 2015).

Histopatologia e Aspectos Clínicos do Câncer de Cólon e de Reto

Aproximadamente 90% dos casos de CCR são classificados como adenocarcinomas (World Cancer Research Fund International, 2012), originados de células epiteliais da mucosa colorretal (FLEMING et al., 2012). Eles podem ainda ser classificados em tubular, viloso e misto (PASCHKE et al., 2018). Outros tipos de câncer mais raros são os mucinosos, de células escamosas, de fuso celular, carcinomas não diferenciados e carcinoma de células de anel de sinete (NAGTEGAAL; HUGEN, 2015; PASCHKE et al., 2018). São observadas diferenças na histologia dos cânceres de cólon e de reto, lesões na mucosa com componente vilosos são mais comuns nos tumores de reto do que nos outros sítios do intestino grosso e apresentam maior potencial de transformação maligna o que mostra que podem haver vias moleculares distintas envolvidas na carcinogênese do colón direito, colón esquerdo e reto (KONISHI et al., 1999).

O estadiamento do CCR é feito através do sistema TMN da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que se baseia no tamanho do tumor e disseminação para os tecidos próximos (Tis – T4b), número de linfonodos regionais acometidos por metástase (N0 - N2) e presença e número de metástases à distância (M0 – M1b); os tumores são então classificados em estádios anatomopatológicos (I – IVB) do melhor para o pior prognóstico

(GLIMELIUS et al., 2013; HOFMEISTER et al., 2016). O *status* TNM se mostrou fortemente associado com a sobrevida, com uma maior diferença observada em pacientes com tumores T2 vs T4 (16,5 meses e 8 meses, respectivamente) e N0 vs N2 (19 meses e 8 meses, respectivamente) (RIIHIMÄKI et al., 2016). Além disso, invasão vascular extramural detectada por ressonância magnética está associada com pior prognóstico, principalmente com desenvolvimento de metástase à distância (GLIMELIUS et al., 2013).

Em um cenário ideal o processo de estadiamento é realizado a partir de colonoscopia, biópsia, tomografia, ultrassom e exames bioquímicos e refeitos após a conclusão da terapia neoadjuvante (HOFMEISTER et al., 2016). O tratamento para tumores da porção proximal do reto é a ressecção cirúrgica primária, porém em tumores na porção distal uma terapia local mais agressiva é utilizada no tratamento. Para o câncer de reto localmente avançado, radioterapia ou quimio-radioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia de excisão mesorretal total é o tratamento padrão, porém apresenta uma taxa de recorrência local de 10% em cinco anos (MASSARWEH; ARTINYAN; CHANG, 2016; VAN CUTSEM et al., 2016).

Outro ponto muito importante são as diferenças nos padrões metastáticos dos tumores de cólon e de reto. Um estudo que incluiu dados de autópsia de 1.675 pacientes com CCR metastático mostrou que as metástases abdominais são mais frequentemente associadas com tumores de cólon, enquanto as metástases em sítios extra-abdominais são mais frequentes nos tumores de reto (HUGEN et al., 2014). Isso se deve a drenagem venosa das regiões, no cólon e partes altas do reto o sangue é drenado pelo sistema porta hepático, já as regiões media e baixa do reto o sangue é drenado pela veia inferior do reto, que se liga na veia cava inferior, sendo transportado diretamente para o pulmão (ABREU et al., 2011). Logo não é surpreendente que os principais sítios metastáticos sejam o fígado e peritônio para os tumores de cólon e pulmão e ossos para os tumores de reto (KORNMAN et al., 2013; RIIHIMÄKI et al., 2016).

Com os avanços no tratamento do CCR, observou-se uma heterogeneidade na evolução clínica dos pacientes, mesmo dentre aqueles com características histopatológicas semelhantes. Assim, estudos genéticos e epigenéticos têm sido conduzidos para identificação dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento e progressão dos CCR, com intuito de identificar os pacientes de risco e aprimorar o tratamento destes indivíduos.

Genética molecular dos CCR

Aproximadamente dois terços de todos os casos de CCR são esporádicos onde o surgimento da doença se dá devido à combinação de diversos fatores genéticos e epigenéticos (CARETHERS; JUNG, 2015). Nos últimos 30 anos houve um notável progresso na compreensão das vias moleculares envolvidas na transformação maligna dos tumores colorretais. Este conhecimento tem mudado as estratégias de diagnóstico e tratamento do CCR (OBUCH; AHNEN, 2016).

O modelo de progressão do carcinoma colorretal foi proposto por Volgestein e colaboradores em 1990. O adenocarcinoma seria o resultado da progressão de um adenoma para carcinoma em decorrência do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que levam a instabilidade cromossômica e desequilíbrio de funções celulares que favorecem a carcinogênese. Neste modelo foi descrito que mutações no oncogene *KRAS* e perda de heterozigose (LOH - do inglês *Loss of Heterozygosity*) no *locus* do gene supressor tumoral *APC* ocorrem inicialmente no processo de tumorigênese; ao passo que LOH em 18q e em 17p (*TP53*) ocorrem mais tardiamente no processo de formação do CCR (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). Entretanto, esses eventos isoladamente não conseguem explicar a complexidade e a heterogeneidade da progressão no CCR.

O conhecimento acumulado sobre as alterações moleculares presentes no CCR mostrou três principais vias genéticas e epigenéticas envolvidas na carcinogênese colorretal (Figura 1) instabilidade cromossômica (*chromosomal instability* – CIN), instabilidade de microssatélites (MSI), e

fenótipo metilador das ilhas CpG (*CpG island methylator phenotype* - CIMP) (revisado em TAMAS et al., 2015)(DEEN et al., 2016). Essa vias também apresentam frequências diferentes entre os CCR (PASCHKE et al., 2018).

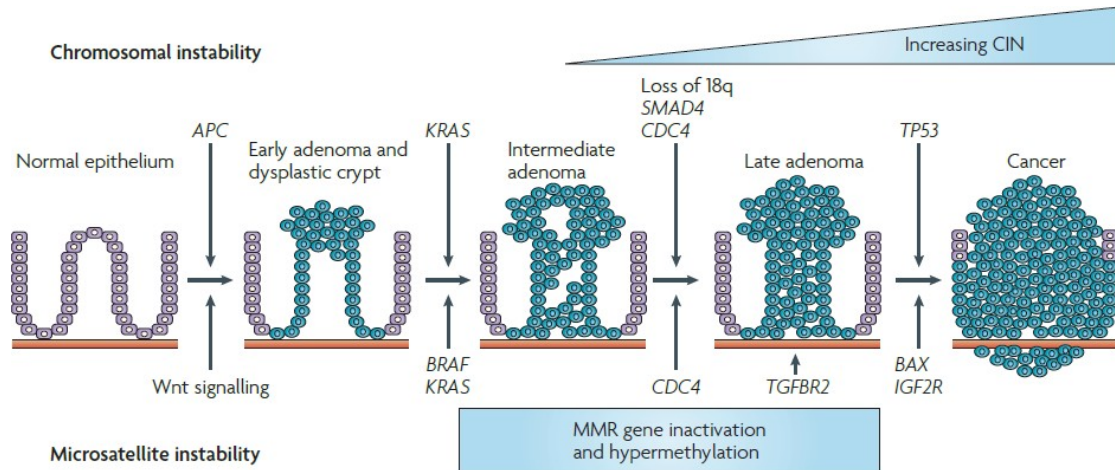


Figura 1. Modelo de progressão de adenoma a carcinoma no câncer colorretal.(Figura retirada de WALTHER et al., 2009)

A instabilidade cromossômica é caracterizada principalmente por aneuploidia e LOH, e é observada principalmente nos tumores de reto e cólon distal (SANZ-PAMPLONA et al., 2011). CIN é observada em cerca de 70% dos CCR esporádicos, com ganhos e perdas de grandes regiões cromossômicas ou até de cromossomos inteiros. Essas alterações favorecem o surgimento de aneuploidias e perdas de heterozigoses (LOH) e, conseqüentemente, defeitos na segregação das cromátides, instabilidade dos telômeros e dano ao DNA. Sua causa exata ainda não é conhecida, porém mutações nos oncogênes e genes supressores como *APC*, *TP53*, *KRAS*, *CTNNB1* e *PIK3CA* estão associadas (PINO; CHUNG, 2010).

Instabilidade de microssatélites (MSI) está associada com a inativação de genes que mantêm a estabilidade do DNA e fazem o reparo de erros de replicação do DNA. É mais comum nos tumores de cólon proximal e é resultante principalmente de hipermetilação do promotor do gene *MLH1*,

levando ao silenciamento deste gene (NAWA et al., 2008). Os CCR são divididos em três categorias, positivos para instabilidade de microssatélites (MSI), instabilidade alta (MSI-H - *Microsatellite Instability-High*) e microssatélites estáveis (MSS), sendo que aproximadamente 15% dos CCR são MSI. Pacientes com tumores com MSI são em geral mais velhos e apresentam, além da mutação em *BRAF* (V600E), ausência da expressão proteica de MLH1 e PMS2, acúmulo de mutações em genes com sequências repetitivas como *TGFR2*, *IGFR2*, *BAX* e *E2F4* (JORISSEN et al., 2008). Tumores com estas alterações se mostram resistentes ao tratamento com inibidores de *EGFR*. Além disso, apresentam infiltrado linfocitário intenso, sugestivo de uma forte resposta imune antitumoral. Tumores com MSI em geral apresentam melhor prognóstico (revisado em GRAHAM et al., 2016)(SINICROPE; SARGENT, 2012).

Os tumores com o fenótipo metilador das ilhas CpG (CIMP) são caracterizados pelo excesso de ilhas hipermetiladas, resultando na inativação de diversos genes supressores tumorais, como o *CDKN2*, que codifica p16 (MOJARAD et al., 2013). Este tipo de alteração epigenética ocorre mais frequentemente em adenocarcinomas serrilhados sésseis do cólon proximal e é frequentemente acompanhada de MSI, usualmente há hipermetilação do gene *MLH1* (SANZ-PAMPLONA et al., 2011). CIMP também pode ser encontrada com menos frequência nos adenocarcinoma serrilhados tradicionais do cólon distal e reto, onde o gene hipermetilado é o *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), um gene importante com função de reparo do DNA principalmente a agentes alquilantes (revisado em TAMAS et al., 2015). Os tumores do subgrupo CIMP ocorrem com maior frequência em pacientes do sexo feminino e em pacientes mais velhos. Estes tumores apresentam alta taxa de mutações nos oncogenes *KRAS* ou *BRAF*, porém não apresentam mutação no gene supressor tumoral *TP53* (revisado em MOJARAD et al., 2013).

Em 2012, foi publicado um estudo conduzido pelo consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (WEINSTEIN et al., 2013) que mostrou a caracterização molecular de amostras de CCR (N=276) integrando dados genômicos, transcritômicos e epigenômico. A análise genômica, resultante da comparação de 224 CCR e tecidos adjacentes pareados, mostrou uma baixa

taxa de mutação em 84% das amostras de CCR, que foi definida como tumores não-hipermutados. Os 16% restantes mostraram altas taxas de mutação e foram definidos como tumores hipermutados. Entre os tumores não-hipermutados, os oito genes com maior frequência de mutação foram *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2* e *NRAS*. Os tumores hipermutados por sua vez apresentaram mais frequentemente mutação nos genes *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *MSH3*, *MSH6*, *SLC9A9* e *TCF7L2*, juntamente com a mutação em *BRAF* (*V600E*). Curiosamente, os genes *APC* e *TP53*, frequentemente mutados nos tumores não-hipermutados (60% e 81% respectivamente), apresentaram menor frequência de mutação nos tumores hipermutados (20% e 51% respectivamente). Cerca de 75% dos tumores hipermutados apresentaram também alta MSI-H, com hipermetilação e silenciamento do gene *MLH1*; os 25% restantes apresentaram mutações somáticas no gene de reparo *POLE*. Foi observado também que o perfil de mutações dos tumores não-hipermutados era semelhante entre câncer de cólon e de reto, porém 75% dos tumores hipermutados, e a maioria dos tumores com hipermetilação, eram originárias do cólon proximal. Esses dados sugerem que os tumores não-hipermutados correspondem ao subgrupo CIN e os tumores hipermutados ao subgrupo MSI.

Em 2015, a partir dos perfis de expressão de um grande número de tumores, incluindo os tumores do TCGA foram definidos os quatro subtipos moleculares do câncer de colón e reto (*consensus molecular subtypes*) (GUINNEY et al., 2016). São eles; CMS1 (MSI imune), CMS2(Canônico), CMS3 (Metabólico) e CMS4 (Mesenquimal). O subgrupo CMS1 (MSI imune), que compreendia 14% dos tumores, tem como características predominantes a instabilidade de microssatélites (MSI) acompanhada de CIMP muito prevalente, hipermutação, e perfil transcricional associado a forte ativação da resposta imune, pior taxa de sobrevida após recidiva do tumor. Esse subtipo é mais comum em tumores de colón ascendente. O subtipo CMS2 (canônico) foi identificado em 37% dos tumores, sendo mais comum nos tumores das regiões de colón sigmoide e reto; apresenta um perfil transcricional associado à diferenciação epitelial, variações do número de cópias genômicas (SCNV – *Somatic Copy Number Variation*) e ativação das vias de sinalização de WNT e

MYC. Ganhos e/ou ampliações em oncogenes e perdas cromossômicas em genes supressores tumorais foram também observadas neste subtipo molecular. O subtipo CMS3 (metabólico) incluiu 13% dos casos e apresenta status misto de MSI, baixa incidência de SNCV e CIMP, mutações em *KRAS* e desregulações metabólicas; esse subtipo tem um perfil transcricional semelhante ao subtipo metabólico descrito em câncer gástrico e é um dos subtipos menos comuns. Por último, o subtipo CMS4 (mesenquimal), compreendendo 23% dos tumores, apresenta aumento de expressão de genes associados à transição epitélio-mesênquima (TEM) e uma assinatura de ativação da via de sinalização do TGF- β , bem como de angiogênese, remodelamento de matriz extracelular, infiltração estromal e pior sobrevida. Interessantemente, 13% dos casos apresentaram aspectos mistos, que os autores atribuíram a um provável fenótipo de transição ou heterogeneidade intratumoral (GUINNEY et al., 2016; LOREE et al., 2018).

Apesar da contribuição destes estudos para o conhecimento dos mecanismos moleculares associados com o desenvolvimento dos tumores colorretais, as alterações associadas com a progressão metastática ainda não são completamente conhecidas. Sabe-se que o processo envolve uma série de eventos conhecidas como cascata de invasão e metástase, cujas bases biológicas e moleculares ainda não estão completamente estabelecidas (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). Um número crescente de evidências sugere que alterações epigenéticas, e não mutações em *drivers* metastáticos, são os eventos predominantes para a aquisição do fenótipo metastático. As alterações epigenéticas participam da regulação de sinais oncogênicos associados com a disseminação do tumor (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016; PATEL; VANHARANTA, 2016).

Há poucos relatos de perfil transcricional de CCR de pacientes brasileiros. Estudos avaliaram perfil de expressão gênica em 25 CR para identificar genes associados com resposta à terapia neoadjuvante e identificaram 27 genes diferencialmente expressos, porém nenhum classificador foi capaz de identificar corretamente os casos respondedores dos não respondedores (LOPES-RAMOS et al., 2015).

Carvalho et al. (2017) avaliaram a expressão dos genes *EGFR* e *KRAS*, em amostras de 50 CCR e 20 tecidos adjacentes não neoplásicos. Porém, não foi detectada diferença na expressão de *EGFR* e *KRAS* (CARVALHO et al., 2017)

Contexto imunológico e prognóstico no CCR

Tumores não são simplesmente massas de células malignas. Além das células tumorais, o microambiente do tumor, que, entre outros tipos celulares, inclui as células imunes, tem papel fundamental na progressão do tumor. Os infiltrados imunes dos tumores são compostos por diferentes células associadas com a resposta imune inata e adaptativa, cuja distribuição varia entre diferentes tumores e mesmo no mesmo tipo tumoral, sendo associados com o prognóstico em diversos tumores, inclusive em CCR (BERNTSSON et al., 2017; GALON et al., 2006; MLECNİK et al., 2016).

A presença de um maior infiltrado imune foi associada com tumores que apresentavam menor invasão vascular, linfática e perineural (IVLP). A resposta imune protetora é mediada pelas células T de memória efetora. Níveis aumentados de células T CD8+, T CD4+, T CD3+, Th1 e Interferon γ (IFN- γ) foram observados em CCR negativos para IVLP, sendo que níveis ainda mais altos foram observados nos tumores de pacientes que não apresentaram recidiva. Por outro lado, estágios avançados de invasão linfonodal em CCR foram associados com baixa densidade do marcador de células imune *naïve* CD45RA, essa associação foi detectada como um fator prognóstico independente para sobrevida nestes tumores (PAGÈS et al., 2005).

A imunoterapia tem ganhado cada vez mais destaque no tratamento do câncer, para tanto, a correta seleção dos candidatos é fundamental, o que aumenta a atenção para relação dos aspectos tumorais moleculares e status imunológico, inclusive nos CCRs (RILEY et al., 2018). Resultados promissores têm sido obtidos com os inibidores de *checkpoint* imune, anticorpos direcionados para moléculas que inibem o sistema imune, impedindo a ação dos linfócitos T, tais como CTLA-4, PD-1 e seu ligante PD-L1. A interação entre PD-1/PD-L1 tem um papel fundamental na supressão da resposta de linfócitos

T *in vivo*, especialmente no microambiente tumoral, porém apenas uma pequena parcela de pacientes pode se beneficiar deste tipo de terapia (TOPALIAN et al., 2016).

Recentemente a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou para uso o nivolumab e pembrolizumab, dois bloqueadores no *checkpoint* imune de PD-1 para tratamento de pacientes de CCR com alta instabilidade de microssatélites (MSI+). E no caso do pembrolizumab, para todos os pacientes MSI+ ou com deficiência em *mismatch repair* (MMR-D). Respostas eficazes e duradouras foram observadas no tratamento de pacientes de câncer de endométrio, estômago e CCR. Inclusive a combinação de anti-PD-1 (nivolumab) e anti-CTLA4 (ipilimumab) se mostrou eficaz no tratamento de pacientes de CCR metastático, promovendo resposta clínica duradoura e melhor sobrevida em CCR metastáticos MSI+ e MMR-D (GRASSO et al., 2018; NISHINO et al., 2017; OVERMAN et al., 2017). Porém a maioria dos casos de CCR, incluindo a maioria dos tumores de reto, são tumores que apresentam estabilidade de microssatélites (MSS), que apresentam baixas taxas de infiltração de linfócitos T e não respondem ao tratamento com bloqueadores do *checkpoint* imune (MERLANO et al., 2017)

Assim, a quantificação das diferentes populações de células imunes infiltrantes pode auxiliar na compreensão dos mecanismos que coordenam a resposta imune antitumor, com vistas ao desenvolvimento de novas terapias. Os métodos tradicionais de quantificação do infiltrado imune são imunohistoquímica, imunofluorescência e citometria de fluxo (FINOTELLO; TRAJANOSKI, 2018). Ferramentas de bioinformática têm sido usadas para quantificar as subpopulações celulares do infiltrado inflamatório no tecido tumoral a partir de dados de expressão gênica global (HACKL et al., 2016).

O método mais comum para análise do perfil imune é a análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA). O resultado é avaliado por meio de escores de enriquecimento, onde os extremos (escore alto e baixo) indicam genes mais ou menos expressos, respectivamente, para cada população celular investigada. Um uso alternativo desse método é a análise de enriquecimento para amostra única (ssGSEA), onde escores individuais de

enriquecimento são obtidos para cada amostra avaliada. Esse método foi utilizado pelo algoritmo xCell (ARAN; HU; BUTTE, 2017), cuja principal vantagem é não exigir um número grande amostras tornando-se aplicável em um número maior de estudos.

Outro método utilizado é o método de deconvolução, onde a partir de uma matriz de expressão gênica são estimadas proporções das populações de células nas amostras avaliadas, seguido pela normalização dos dados. Uma plataforma que utiliza esse método é a CIBERSORT que utiliza uma matriz de expressão com 22 subpopulações imunes como assinatura. Para a comparação das amostras de interesse é usado um vetor de suporte linear que diminuir os sinais de interferência nas análises (NEWMAN et al., 2015).

Assim, algoritmos como CIBERSORT (NEWMAN et al., 2015), TIMER (LI et al., 2017), MCP-counter (BECHT et al., 2016b), xCell (ARAN; HU; BUTTE, 2017) e EPIC (RACLE et al., 2017) são capazes de quantificar indiretamente subpopulações de células imunes infiltrantes do tumor, auxiliando na compreensão do contexto imunológico dos tumores. A Tabela 1 mostra um resumo das principais características destes algoritmos.

Em resumo, análise de células imunes infiltrantes tumorais pode servir como um biomarcador prognóstico. Além disso, os linfócitos T são populações celulares heterogêneas, além de outras células do sistema imune, como células *natural killers* (NK), linfócitos B, células dendríticas e macrófagos, também podem ter um papel relevante na progressão tumoral. Assim mais estudos são necessários para melhor compreensão das interações tumor-sistema imune, bem como para sua aplicação clínica como biomarcadores.

Desta forma, o objetivo principal deste estudo é identificar assinaturas moleculares e perfis imunológicos distintos associados com a progressão metastática nos adenocarcinomas de reto.

Tabela 1. Descrição dos principais algoritmos de predição de populações imunes utilizando dados de transcrito.

Plataforma	Método de Estimativa	Populações Celulares	Disponibilidade	Autores
xCell	ssGSEA	64 populações imunes e não imunes	http://xcell.ucsf.edu/ (Script R e ferramenta online)	ARAN, D et. al. 2017.
MCP-counter	Médias geométricas de expressão de marcadores gênicos	8 populações imunes, fibroblastos e células endoteliais	http://github.com/ebecht/MCPcounter (Script R)	BECHT et. al. 2016.
CIBERSORT	Vetor de suporte linear	22 populações imunes	https://cibersort.stanford.edu/ (Script R e ferramenta online)	NEWMAN et. al. 2015.
TIMER	Regressão linear dos quadrados mínimos	6 populações imunes	https://cistrome.shinyapps.io/timer/ (Ferramenta online)	LI et. al. 2017.
EPIC	Regressão dos quadrados mínimos restrita	6 populações imunes, fibroblastos, células endoteliais e células não caracterizadas	https://gfellerlab.shinyapps.io/EPIC_1-1/ (Script R e ferramenta online)	RACLE et. al. 2017.

CONCLUSÕES

Neste estudo o perfil transcritômico permitiu identificar genes associados com a progressão metastática que no futuro poderão ser utilizados como biomarcadores para predição do prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto. Dentre eles, aumento de expressão do gene *ANLN* mostrou-se associado aos tumores metastáticos e relacionado com pior sobrevida no câncer de reto. Este gene foi também identificado na validação com dados do TCGA. Foi possível identificar os subtipos moleculares CMS nas amostras do TCGA, no entanto como a predição dos subtipos moleculares é dependente do tamanho amostral, não foi possível identificá-los em nossas amostras de CR. O algoritmo xCell mostrou-se eficiente para identificação de populações celulares nos tumores utilizando tanto dados de RNAseq quanto de microarray. Os tumores de reto metastáticos mostraram-se enriquecidos para células dendríticas plasmocitóides, linfócitos Th2 e T reguladores, consistente com mecanismos de evasão imune tumoral, que podem facilitar a progressão do câncer. Em conjunto foi possível identificar alterações moleculares e imunológicas associadas com a progressão metastática nos tumores de reto que podem ter futura aplicação na medicina de precisão.

REFERÊNCIAS

- A , . .; A , . .; A , F. C.; A , . . . ectal cancer epidemiology. **Rectal Cancer - A Multidisciplinary Approach to Management**, [s. l.], p. 3, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/rectal-cancer-a-multidisciplinary-approach-to-management>>
- AMIN, M. B.; EDGE, S.; GREENE, F.; BYRD, D. R.; BROOKLAND, R. K.; WASHINGTON, M. K.; GERSHENWALD, J. E.; COMPTON, C. C.; HESS, K. R.; SULLIVAN, D. C.; JESSUP, J. M.; BRIERLEY, J. D.; GASPARD, L. E.; SCHILSKY, R. L.; BALCH, C. M.; WINCHESTER, D. P.; ASARE, E. A.; MADERA, M.; GRESS, D. M.; MEYER, L. R. **AJCC Cancer Staging Manual**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.springer.com/us/book/9783319406176>>. Acesso em: 2 jan. 2019.
- ARAN, D.; HU, Z.; BUTTE, A. J. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. **Genome Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 220, 2017. Disponível em: <<http://xcell.ucsf.edu/>>. Acesso em: 5 nov. 2018.
- ARNOLD, M.; SIERRA, M. S.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/>>. Acesso em: 29 out. 2018.
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene ontology: Tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802651>>. Acesso em: 1 out. 2018.
- ASPOD, C.; LECCIA, M.-T.; CHARLES, J.; PLUMAS, J. Plasmacytoid Dendritic Cells Support Melanoma Progression by Promoting Th2 and Regulatory Immunity through OX40L and ICOSL. **Cancer Immunology Research**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 402–415, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778133>>. Acesso em: 7 jan. 2019.
- BECHT, E.; DE REYNIÈS, A.; GIRALDO, N. A.; PILATI, C.; BUTTARD, B.; LACROIX, L.; SELVES, J.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; LAURENT-PUIG, P.; FRIDMAN, W. H. Immune and stromal classification of Colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 22, n. 16, p. 4057–4066, 2016. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26994146>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- BECHT, E.; GIRALDO, N. A.; LACROIX, L.; BUTTARD, B.; ELAROUCI, N.; PETITPREZ, F.; SELVES, J.; LAURENT-PUIG, P.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; FRIDMAN, W. H.; DE REYNIÈS, A. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. **Genome Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2016. b. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13059-016-1070-5>>. Acesso em: 1 out. 2018.
- BEKEREDJIAN-DING, I.; SCHÄFER, M.; HARTMANN, E.; PRIES, R.; PARCINA, M.; SCHNEIDER, P.; GIESE, T.; ENDRES, S.; WOLLENBERG, B.; HARTMANN, G. Tumour-derived prostaglandin E 2 and transforming growth factor- β synergize to inhibit

plasmacytoid dendritic cell-derived interferon- α . **Immunology**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. 439–450, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067543>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

BERNTSSON, J.; SVENSSON, M. C.; LEANDERSSON, K.; NODIN, B.; MICKE, P.; LARSSON, A. H.; EBERHARD, J.; JIRSTRÖM, K. The clinical impact of tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer differs by anatomical subsite: A cohort study. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 141, n. 8, p. 1654–1666, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601279/pdf/IJC-141-1654.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

BHATTACHARYA, R.; FAN, F.; WANG, R.; YE, X.; XIA, L.; BOULBES, D.; ELLIS, L. M. Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 848–855, 2017. Disponível em: <www.bjancer.com>. Acesso em: 8 jan. 2019.

BHATTACHARYA, R.; YE, X. C.; WANG, R.; LING, X.; MCMANUS, M.; FAN, F.; BOULBES, D.; ELLIS, L. M. Intracrine VEGF signaling mediates the activity of prosurvival pathways in human colorectal cancer cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 76, n. 10, p. 3014–3024, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26988990>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1790, n. 11, p. 1555–1568, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416509000592>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

BURKHOLDER, B.; HUANG, R. Y.; BURGESS, R.; LUO, S.; JONES, V. S.; ZHANG, W.; LV, Z. Q.; GAO, C. Y.; WANG, B. L.; ZHANG, Y. M.; HUANG, R. P. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1845, n. 2, p. 182–201, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X14000110?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 149, n. 5, p. 1177–1190, 2015.

CARLETON, M.; MAO, M.; BIERY, M.; WARRENER, P.; KIM, S.; BUSER, C.; MARSHALL, C. G.; FERNANDES, C.; ANNIS, J.; LINSLEY, P. S. RNA Interference-Mediated Silencing of Mitotic Kinesin KIF14 Disrupts Cell Cycle Progression and Induces Cytokinesis Failure. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 3853–3863, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1488988/pdf/2335-05.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

CARMELET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, [s. l.], v. 473, n. 7347, p. 298–307, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593862>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

CARVALHO, B. S.; IRIZARRY, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 26, n. 19, p. 2363–2367, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btq431>>. Acesso em: 1 out. 2018.

CARVALHO, T. I. De; NOVAIS, P. C.; LIZARTE NETO, F. S.; SICCHIERI, R. D.; ROSA, M. S. T.; CARVALHO, C. A. M. De; TIRAPELLI, D. P. da C.; PERIA, F. M.;

ROCHA, J. J. R. Da; FÉRES, O. Analysis of gene expression EGFR and KRAS, microRNA-21 and microRNA-203 in patients with colon and rectal cancer and correlation with clinical outcome and prognostic factors. **Acta Cirurgica Brasileira**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 243–250, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502017000300243&lng=en&tlng=en>

CHEN, B.; RAO, X.; HOUSE, M. G.; NEPHEW, K. P.; CULLEN, K. J.; GUO, Z. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 309, n. 1, p. 37–45, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383511002795>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

CHEN, K.; YU, W.; MA, X.; YAO, K.; JIANG, Q. The association between drinking water source and colorectal cancer incidence in Jiashan County of China: A prospective cohort study. **European Journal of Public Health**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 652–656, 2005. Disponível em: <<http://academic.oup.com/eurpub/article/15/6/652/440041/The-association-between-drinking-water-source-and>>. Acesso em: 30 out. 2018.

CHOI, H.; NA, K. J.; KWON JOONG NA. Integrative analysis of imaging and transcriptomic data of the immune landscape associated with tumor metabolism in lung adenocarcinoma: Clinical and prognostic implications. **Theranostics**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1956–1965, 2018. Disponível em: <<http://www.thno.org>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

CHRAA, D.; NAIM, A.; OLIVE, D.; BADOU, A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], n. September, p. 1–13, 2018.

DE HOON, M. J. L.; IMOTO, S.; NOLAN, J.; MIYANO, S. Open source clustering software. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1453–1454, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bth078>>. Acesso em: 6 nov. 2018.

DEEN, K. I.; SILVA, H.; DEEN, R.; CHANDRASINGHE, P. C. Colorectal cancer in the young, many questions, few answers. **World journal of gastrointestinal oncology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 481–8, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/esps/>>

DEMOULIN, S.; HERFS, M.; DELVENNE, P.; HUBERT, P. Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 343–352, 2013. Disponível em: <www.jleukbio.org>. Acesso em: 6 jan. 2019.

DENG, Y. Rectal Cancer in Asian vs. Western Countries: Why the Variation in Incidence? **Current Treatment Options in Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 64, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11864-017-0500-2>>. Acesso em: 30 out. 2018.

EIDE, P. W.; BRUUN, J.; LOTHE, R. A.; SVEEN, A. CMScaller: An R package for consensus molecular subtyping of colorectal cancer pre-clinical models. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 16618, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-16747-x>>. Acesso em: 1 out. 2018.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Genetics**, [s. l.], v. 95, p. 14863–14868, 1998. Disponível em: <www.pnas.org>. Acesso em: 6 nov. 2018.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 759–767, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735>>. Acesso em: 25 fev. 2018.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31937>>. Acesso em: 29 out. 2018.

FINOTELLO, F.; TRAJANOSKI, Z. New strategies for cancer immunotherapy: Targeting regulatory T cells. **Genome Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 10, 2017. Disponível em: <<http://biogps.org>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

FINOTELLO, F.; TRAJANOSKI, Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 1031–1040, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00262-018-2150-z>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S. F.; WANG, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 153–173, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; LAGORCE-PAGÈS, C.; TOSOLINI, M.; CAMUS, M.; BERGER, A.; WIND, P.; ZINZINDOHOUE, F.; BRUNEVAL, P.; CUGNENC, P.-H.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W.-H.; PAGÈS, F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 313, n. 5795, p. 1960–4, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008531>>. Acesso em: 1 nov. 2018.

GHIDINI, M.; PETRELLI, F.; TOMASELLO, G. Right Versus Left Colon Cancer: Resectable and Metastatic Disease. **Current Treatment Options in Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 31, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29796712>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

GLIMELIUS, B.; TIRET, E.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D.; LABIANCA, R.; NORDLINGER, B.; BERETTA, G. D.; MOSCONI, S.; MANDALÀ, M.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D.; GLIMELIUS, B.; TIRET, E.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D.; LABIANCA, R.; NORDLINGER, B.; BERETTA, G. D.; MOSCONI, S.; MANDALÀ, M.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 24, n. SUPPL.6, 2013.

GLYNNE-JONES, R.; WYRWICZ, L.; TIRET, E.; BROWN, G.; RÖDEL, C.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 28, n. suppl_4, p. iv22-iv40, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl_4/iv22/3958158>. Acesso em: 5 jan. 2019.

GRAHAM, D. M.; COYLE, V. M.; KENNEDY, R. D.; WILSON, R. H. Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 141–150, 2016.

GRASSO, C. S. et al. Genetic mechanisms of immune evasion in colorectal cancer.

Cancer Discovery, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 730–749, 2018. Disponível em: <<http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-17-1327>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

GUINNEY, J.; DIENSTMANN, R.; WANG, X.; DE REYNIES, A.; SCHLICKER, A.; SONESON, C.; MARISA, L.; ROEPMAN, P.; NYAMUNDANDA, G.; AL., E. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.4015>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

HACKL, H.; CHAROENTONG, P.; FINOTELLO, F.; TRAJANOSKI, Z. Computational genomics tools for dissecting tumour-immune cell interactions. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 441–458, 2016.

HALL, P. A.; TODD, C. B.; HYLAND, P. L.; MCDADE, S. S.; GRABSCH, H.; DATTANI, M.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. E. H. The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 19, p. 6780–6786, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16203764>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

HOFMEISTER, C.; HOLMBERG, L.; HOLSTEIN, S.; KASSIM, A.; Ξ, M.; KRISHNAN, A. Y.; KUMAR, S. K.; ANDERSON, K. C.; SYBIL BIERMANN, J.; CHANDLER, J. C.; JUDE, S.; COSTELLO, C.; DJULBEGOVIC, B.; FUNG, H. C.; GODBY, K.; SINGHAL, S.; SMITH, C.; SOMLO, G.; STOCKERL-GOLDSTEIN, K.; TREON, S. P.; WEBER, D.; YAHALOM, J.; SLOAN KETTERING CANCER CENTER NCCN STAFF RASHMI KUMAR, M.; SHEAD, D. A. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Rectal Cancer Version 2.2016. [s. l.], 2016.

HUGEN, N.; VAN DE VELDE, C. J. H.; DE WILT, J. H. W.; NAGTEGAAL, I. D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 651–657, 2014.

IKOMA, N.; YOU, Y. N.; BEDNARSKI, B. K.; MIGUEL A. RODRIGUEZ-BIGAS, C. E.; DAS, P.; KOPETZ, S.; MESSICK, C.; SKIBBER, J. M.; CHANG, G. J. Impact of Recurrence and Salvage Surgery on Survival After Multidisciplinary Treatment of Rectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 35, n. 23, p. 2631–2637, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.2016>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

INCA. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System** International Agency for Research on Cancer. [s. l.], [s. n.]. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11829087&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/C02A82F1-823F-4021-94A7-4D1CE0C4214D%0Ahttp://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.01.00275301>>. Acesso em: 2 jan. 2019.

JORISSEN, R. N.; LIPTON, L.; GIBBS, P.; CHAPMAN, M.; DESAI, J.; JONES, I. T.; YEATMAN, T. J.; EAST, P.; TOMLINSON, I. P. M.; VERSPAGET, H.; AALTONEN, L. A.; KRUGHØFFER, M.; ØRNTOFT, T. F.; ANDERSEN, C. L.; SIEBER, O. M. DNA copy-number alterations underlie gene expression differences between microsatellite stable and unstable colorectal cancers. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 14, n. 24, p. 8061–8069, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>>. Acesso em: 1

nov. 2018.

KONISHI, K.; FUJII, T.; BOKU, N.; KATO, S.; KOBAYASHI, I.; OHTSU, A.; TAJIRI, H.; OCHIAI, A.; YOSHIDA, S. Clinicopathological differences between colonic and rectal carcinomas: Are they based on the same mechanism of carcinogenesis? **Gut**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 818–821, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1727756/pdf/v045p00818.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2018.

KORNMAN, M.; STAIB, L.; WIEGEL, T.; KRON, M.; HENNE-BRUNS, D.; LINK, K.-H.; FORMENTINI, A. Long-Term Results of 2 Adjuvant Trials Reveal Differences in Chemosensitivity and the Pattern of Metastases Between Colon Cancer and Rectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 54–61, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1533002812001077>>. Acesso em: 31 out. 2018.

KULESHOV, M. V.; JONES, M. R.; ROUILLARD, A. D.; FERNANDEZ, N. F.; DUAN, Q.; WANG, Z.; KOPLEV, S.; JENKINS, S. L.; JAGODNIK, K. M.; LACHMANN, A.; MCDERMOTT, . . . ; N I , C. D.; ND N, . W.; A'AYAN, A. nrchr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, p. 90–97, 2016. Disponível em: <<http://genome.ucsc.edu/ENCODE>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017.

LEE, Y. C.; LEE, Y. L.; CHUANG, J. P.; LEE, J. C. Differences in survival between colon and rectal cancer from SEER data. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. e78709, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078709>>. Acesso em: 25 fev. 2018.

LI, T.; FAN, J.; WANG, B.; TRAUGH, N.; CHEN, Q.; LIU, J. S.; LI, B.; LIU, X. S. TIMER: A web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 77, n. 21, p. e108–e110, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6042652/pdf/nihms893284.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2018.

LIU, J. Q.; LI, X. Y.; YU, H. Q.; YANG, G.; LIU, Z. Q.; GENG, X. R.; WANG, S.; MO, L. H.; ZENG, L.; ZHAO, M.; FU, Y. T.; SUN, H. Z.; LIU, Z. G.; YANG, P. C. Tumor-specific Th2 responses inhibit growth of CT26 colon-cancer cells in mice via converting intratumor regulatory T cells to Th9 cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 10665, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26035423>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

LOPES-RAMOS, C.; KOYAMA, F. C.; HABR-GAMA, A.; SALIM, A. C. M.; BETTONI, F.; ASPRINO, P. F.; FRANÇA, G. S.; GAMA-RODRIGUES, J.; PARMIGIANI, R. B.; PEREZ, R. O.; GALANTE, P. A. F.; CAMARGO, A. A. Comprehensive evaluation of the effectiveness of gene expression signatures to predict complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy and guide surgical intervention in rectal cancer. **Cancer Genetics**, [s. l.], v. 208, n. 6, p. 319–326, 2015.

LOREE, J. M.; PEREIRA, A. A. L.; LAM, M.; WILLAUER, A. N.; RAGHAV, K.; DASARI, A.; VAN MORRIS, K.; ADVANI, S.; MENTER, D. G.; ENG, C.; SHAW, K.; BROADDUS, R.; ROUTBORT, M. J.; LIU, Y.; MORRIS, J. S.; LUTHRA, R.; MERIC-BERNSTAM, F.; OVERMAN, M. J.; MARU, D.; KOPETZ, S. Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and

consensus molecular subtypes. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1062–1072, 2018.

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, [s. l.], v. 529, n. 7586, p. 298–306, 2016.

MASSARWEH, N. N.; ARTINYAN, A.; CHANG, G. J. Neoadjuvant treatment for rectal cancer-A value-based proposition. **Journal of surgical oncology**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 304–10, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jso.24267>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27111410>>

MAURER, C. A.; RENZULLI, P.; KULL, C.; KÄSER, S. A.; MAZZUCHELLI, L.; ULRICH, A.; BÜCHLER, M. W. The impact of the introduction of total mesorectal excision on local recurrence rate and survival in rectal cancer: Long-term results. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 1899–1906, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21298350>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

MERLANO, M. C.; GRANETTO, C.; FEA, E.; RICCI, V.; GARRONE, O. Heterogeneity of colon cancer: From bench to bedside. **ESMO Open**, [s. l.], v. 2, n. 3, 2017.

MI, H.; HUANG, X.; MURUGANUJAN, A.; TANG, H.; MILLS, C.; KANG, D.; THOMAS, P. D. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D183–D189, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210595/pdf/gkw1138.pdf>>. Acesso em: 6 nov. 2018.

MITCHELL, D.; CHINTALA, S.; DEY, M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 322, p. 63–73, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572818300997>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

MLECNIK, B.; BINDEA, G.; KIRILOVSKY, A.; ANGELL, H. K.; OBENAUF, A. C.; TOSOLINI, M.; CHURCH, S. E.; MABY, P.; VASATURO, A.; ANGELOVA, M.; FREDRIKSEN, T.; MAUGER, S.; WALDNER, M.; BERGER, A.; SPEICHER, M. R.; PAGÈS, F.; VALGE-ARCHER, V.; GALON, J. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 327, 2016.

MOJARAD, E. N.; KUPPEN, P. J. K.; AGHDAEI, H. A.; ZALI, M. R. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 120–128, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.2016.303320>>

NAGTEGAAL, I. D.; HUGEN, N. The Increasing Relevance of Tumour Histology in Determining Oncological Outcomes in Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 259–266, 2015.

NAWA, T.; KATO, J.; KAWAMOTO, H.; OKADA, H.; YAMAMOTO, H.; KOHNO, H.; ENDO, H.; SHIRATORI, Y. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 418–423, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2007.04923.x>>. Acesso em: 1 nov. 2018.

NEWMAN, A. M.; LIU, C. L.; GREEN, M. R.; GENTLES, A. J.; FENG, W.; XU, Y.;

HOANG, C. D.; DIEHN, M.; ALIZADEH, A. A. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. **Nature Methods**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 453–457, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmeth.3337>>. Acesso em: 1 out. 2018.

NG, V. Y.; SCHARSCHMIDT, T. J.; MAYERSON, J. L.; FISHER, J. L. Incidence and survival in sarcoma in the United States: A focus on musculoskeletal lesions. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 2597–2604, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>>. Acesso em: 29 out. 2018.

NISHINO, M.; RAMAIYA, N. H.; HATABU, H.; HODI, F. S. Monitoring immune-checkpoint blockade: Response evaluation and biomarker development. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 655–668, 2017.

OBUCH, J. C.; AHNEN, D. J. Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything. **Gastroenterology Clinics of North America**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 459–476, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889855316300371>>

OVERMAN, M. J.; MCDERMOTT, R.; LEACH, J. L.; LONARDI, S.; LENZ, H.; MORSE, M. A.; DESAI, J.; HILL, A.; AXELSON, M.; MOSS, R. A.; GOLDBERG, M. V.; CAO, Z. A.; LEDEINE, J.; MAGLINTE, G. A.; KOPETZ, S.; ANDRÉ, T. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label , multicentre , phase 2 study. **Oncology**, [s. l.], v. 18, n. September, p. 1182–1191, 2017.

PAGÈS, F.; BERGER, A.; CAMUS, M.; SANCHEZ-CABO, F.; COSTES, A.; MOLIDOR, R.; MLECNIK, B.; KIRILOVSKY, A.; NILSSON, M.; DAMOTTE, D.; MEATCHI, T.; BRUNEVAL, P.; CUGNENC, P.-H.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W.-H.; GALON, J. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 25, p. 2654–2666, 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051424>>. Acesso em: 1 nov. 2018.

PASCHKE, S.; JAFAROV, S.; STAIB, L.; KREUSER, E. D.; MAULBECKER-ARMSTRONG, C.; ROITMAN, M.; HOLM, T.; HARRIS, C. C.; LINK, K. H.; KORNMANN, M. Are colon and rectal cancer two different tumor entities? A proposal to abandon the term colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 9, 2018. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/ijms>. Acesso em: 30 out. 2018.

PATEL, S. A.; VANHARANTA, S. Epigenetic determinants of metastasis. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 11, p. 79–96, 2016.

PELOSOF, L.; YERRAM, S.; ARMSTRONG, T.; CHU, N.; DANILOVA, L.; YANAGISAWA, B.; HIDALGO, M.; AZAD, N.; HERMAN, J. G. GPX3 promoter methylation predicts platinum sensitivity in colorectal cancer. **Epigenetics**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 540–550, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1265711>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

PIEKNY, A. J.; MADDUX, A. S. The myriad roles of Anillin during cytokinesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 881–891, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952110001382?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 138, n. 6, p. 2059–2072, 2010.

PRASMICKAITE, L.; TENSTAD, E. M.; PETTERSEN, S.; JABEEN, S.; EGELAND, E. V.; NORD, S.; PANDYA, A.; HAUGEN, M. H.; KRISTENSEN, V. N.; BØRRESEN-DALE, A. L.; ENGEBRÅTEN, O.; MÆLANDSMO, G. M. Basal-like breast cancer engages tumor-supportive macrophages via secreted factors induced by extracellular S100A4. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1540–1558, 2018. Disponível em: <www.osbreac.no>. Acesso em: 14 nov. 2018.

QIN, C.-J.; SONG, X.-M.; CHEN, Z.-H.; REN, X.-Q.; XU, K.-W.; JING, H.; HE, Y.-L. XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 31, 2015. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget/>. Acesso em: 11 jan. 2019.

RACLE, J.; DE JONGE, K.; BAUMGAERTNER, P.; SPEISER, D. E.; GFELLER, D. Simultaneous enumeration of cancer and immune cell types from bulk tumor gene expression data. **eLife**, [s. l.], v. 6, 2017. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/26476>. Acesso em: 15 nov. 2018.

RAHBARI, N. N.; KEDRIN, D.; INCIO, J.; LIU, H.; HO, W. W.; NIA, H. T.; EDRICH, C. M.; JUNG, K.; DAUBRIAC, J.; CHEN, I.; HEISHI, T.; MARTIN, J. D.; HUANG, Y.; MAIMON, N.; REISSFELDER, C.; WEITZ, J.; BOUCHER, Y.; CLARK, J. W.; GRODZINSKY, A. J.; DUDA, D. G.; JAIN, R. K.; FUKUMURA, D. Anti-VEGF therapy induces ECM remodeling and mechanical barriers to therapy in colorectal cancer liver metastases. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 360, p. 360ra135-360ra135, 2016. Disponível em: <www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/8/360/360ra135/DC1>. Acesso em: 8 jan. 2019.

RIIHIMÄKI, M.; HEMMINKI, A.; SUNDQUIST, J.; HEMMINKI, K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, p. 29765, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep29765%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416752%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4945942>

RILEY, J. M.; CROSS, A. W.; PAULO, C. M.; RUBINSTEIN, M. P.; WRANGLE, J.; CA, . . . The Clinical Implications of Immunogenomics in Colorectal Cancer: A Path for Precision Medicine. **American Cancer Society**, [s. l.], p. 1–10, 2018.

RITCHIE, M. E.; PHIPSON, B.; WU, D.; HU, Y.; LAW, C. W.; SHI, W.; SMYTH, G. K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. e47, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4402510/pdf/gkv007.pdf>. Acesso em: 19 out. 2018.

ROHR-UDILOVA, N.; KLINGLMÜLLER, F.; SCHULTE-HERMANN, R.; STIFT, J.; HERAC, M.; SALZMANN, M.; FINOTELLO, F.; TIMELTHALER, G.; OBERHUBER, G.; PINTER, M.; REIBERGER, T.; JENSEN-JAROLIM, E.; EFERL, R.; TRAUNER, M. Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 6220, 2018. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 15 nov. 2018.

SAITO, T.; NISHIKAWA, H.; WADA, H.; NAGANO, Y.; SUGIYAMA, D.; ATARASHI, K.; MAEDA, Y.; HAMAGUCHI, M.; OHKURA, N.; SATO, E.; NAGASE, H.; NISHIMURA, J.; YAMAMOTO, H.; TAKIGUCHI, S.; TANOUE, T.; SUDA, W.; MORITA, H.; HATTORI, M.; HONDA, K.; MORI, M.; DOKI, Y.; SAKAGUCHI, S. Two FOXP3 + CD4 + T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. **Nature Medicine**,

[s. l.], v. 22, n. 6, p. 679–684, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/nm.4086>>

SALMEN, F.; VICKOVIC, S.; LARSSON, L.; STENBECK, L.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; EHINGER, A.; HAKKINEN, J.; BORG, A.; FRISEN, J.; STAHL, P.; LUNDEBERG, J. Multidimensional transcriptomics provides detailed information about immune cell distribution and identity in HER2+ breast tumors. **bioRxiv**, [s. l.], p. 358937, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/358937>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

SANZ-PAMPLONA, R.; CORDERO, D.; BERENGUER, A.; LEJBKOWICZ, F.; RENNERT, H.; SALAZAR, R.; BIONDO, S.; SANJUAN, X.; PUJANA, M. A.; ROZEK, L.; GIORDANO, T. J.; BEN-IZHAK, O.; COHEN, H. I.; TROUGOUBOFF, P.; BEJHAR, J.; SOVA, Y.; RENNERT, G.; GRUBER, S. B.; MORENO, V. Gene expression differences between colon and rectum tumors. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 17, n. 23, p. 7303–7312, 2011. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 31 out. 2018.

SCHÖN, M. P.; SCHÖN, M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. **Oncogene**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 190–199, 2008. Disponível em:
<<http://www.nature.com/articles/1210913>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

SINICROPE, F. A.; SARGENT, D. J. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: Prognostic, predictive, and therapeutic implications. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1506–1512, 2012.

TABERNEIRO, J.; SHAPIRO, G. I.; LORUSSO, P. M.; CERVANTES, A.; SCHWARTZ, G. K.; WEISS, G. J.; PAZ-ARES, L.; CHO, D. C.; INFANTE, J. R.; ALSINA, M.; GOUNDER, M. M.; FALZONE, R.; HARROP, J.; WHITE, A. C. S.; TOUDJARSKA, I.; BUMCROT, D.; MEYERS, R. E.; HINKLE, G.; SVRZIKAPA, N.; HUTABARAT, R. M.; CLAUSEN, V. A.; CEHELKY, J.; NOCHUR, S. V.; GAMBA-VITALO, C.; VAISHNAW, A. K.; SAH, D. W. Y.; GOLLOB, J. A.; BURRIS, H. A. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 406–417, 2013. Disponível em: <www.aacrjournals.org>. Acesso em: 9 jan. 2019.

TAMAS, K.; WALENKAMP, A. M. E.; DE VRIES, E. G. E.; VAN VUGT, M. A. T. M.; BEETS-TAN, R. G.; VAN ETTEN, B.; DE GROOT, D. J. A.; HOSPERS, G. A. P. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. **Cancer Treatment Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 671–679, 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.06.007>>

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Expansion of the gene ontology knowledgebase and resources: The gene ontology consortium. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D331–D338, 2017. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899567>>. Acesso em: 1 out. 2018.

TOPALIAN, S. L.; TAUBE, J. M.; ANDERS, R. A.; PARDOLL, D. M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 275–287, 2016. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27079802>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

VAN CUTSEM, E.; CERVANTES, A.; ADAM, R.; SOBRERO, A.; VAN KRIEKEN, J. H.; ADERKA, D.; ARANDA AGUILAR, E.; BARDELLI, A.; BENSON, A.; BODOKY, G.; CIA DI LL, F.; D', A.; DIAZ-RUBIO, E.; DOUILLARD, J. Y.; DUCREUX, M.; FALCONE, A.; GROTHEY, A.; GRUENBERGER, T.; HAUSTERMANS, K.;

HEINEMANN, V.; HOFF, P.; KÖHNE, C. H.; LABIANCA, R.; LAURENT-PUIG, P.; MA, B.; MAUGHAN, T.; MURO, K.; NORMANNO, N.; ÖSTERLUND, P.; OYEN, W. J. G.; PAPAMICHAEL, D.; PENTHEROUDAKIS, G.; PFEIFFER, P.; PRICE, T. J.; PUNT, C.; RICKE, J.; ROTH, A.; SALAZAR, R.; SCHEITHAUER, W.; SCHMOLL, H. J.; TABERNERO, J.; TAÏEB, J.; TEJPAR, S.; WASAN, H.; YOSHINO, T.; ZANAN, A.; ARNOLD, D. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1386–1422, 2016. Disponível em: <<http://annonc.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/annonc/mdw235>>

WALTHER, A.; JOHNSTONE, E.; SWANTON, C.; MIDGLEY, R.; TOMLINSON, I.; KERR, D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 9, p. 489–499, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc2645>>. Acesso em: 4 fev. 2019.

WANG, G.; SHEN, W.; CUI, L.; CHEN, W.; HU, X.; FU, J. Overexpression of Anillin (ANLN) is correlated with colorectal cancer progression and poor prognosis. **Cancer Biomarkers**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 459–465, 2016. a.

WANG, Q.; WANG, Y.; DU, L.; XU, C.; SUN, Y.; YANG, B.; SUN, Z.; FU, Y.; CAI, L.; FAN, S.; FAN, F.; LIU, Q. Shrna-mediated XRCC2 gene knockdown efficiently sensitizes colon tumor cells to X-ray irradiation in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 2157–2171, 2014. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/ijmsArticle>. Acesso em: 11 jan. 2019.

WANG, W.; SHI, Y.; LI, J.; CUI, W.; YANG, B. Up-regulation of KIF14 is a predictor of poor survival and a novel prognostic biomarker of chemoresistance to paclitaxel treatment in cervical cancer. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. e00315–e00315, 2016. b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820787/pdf/bsr036e315.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

WANG, Z. Z.; YANG, J.; JIANG, B. H.; DI, J. B.; GAO, P.; PENG, L.; SU, X. Q. KIF14 promotes cell proliferation via activation of Akt and is directly targeted by miR-200c in colorectal cancer. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 1939–1952, 2018.

WEINSTEIN, J. N.; COLLISSE, E. A.; MILLS, G. B.; SHAW, K. M.; OZENBERGER, B. A.; ELLROTT, K.; SHMULEVICH, I.; SANDER, C.; STUART, J. M.; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer Analysis Project. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 1113–1120, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3919969/pdf/nihms-549280.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

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 Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 4496–4508, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6144159/pdf/CAM4-7-4496.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

XU, H.; CHOE, C.; SHIN, S. H.; PARK, S. W.; KIM, H. S.; JUNG, S. H.; YIM, S. H.; KIM, T. M.; CHUNG, Y. J. Silencing of KIF14 interferes with cell cycle progression and cytokinesis by blocking the p27Kip1 ubiquitination pathway in hepatocellular carcinoma. **Experimental and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 5, 2014. a. Disponível em: <www.nature.com/emm>. Acesso em: 12 jan. 2019.

XU, K.; SONG, X.; CHEN, Z.; QIN, C.; HE, Y.; ZHAN, W. XRCC2 Promotes colorectal cancer cell growth, regulates cell cycle progression, and apoptosis. **Medicine (United States)**, [s. l.], v. 93, n. 28, p. e294, 2014. b. Disponível em: <www.md-journal.com>. Acesso em: 11 jan. 2019.

ZENG, S.; YU, X.; MA, C.; SONG, R.; ZHANG, Z.; ZI, X.; CHEN, X.; WANG, Y.; YU, Y.; ZHAO, J.; WEI, R.; SUN, Y.; XU, C. Transcriptome sequencing identifies ANLN as a promising prognostic biomarker in bladder urothelial carcinoma. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://david.ncifcrf.gov/>. Acesso em: 4 jan. 2019.

ZHANG, X.; ZHENG, Z.; YINGJI, S.; KIM, H.; JIN, R.; RENSHU, L.; LEE, D. Y.; ROH, M. R.; YANG, S. Downregulation of glutathione peroxidase 3 is associated with lymph node metastasis and prognosis in cervical cancer. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 2587–2592, 2014. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2014.3152>. Acesso em: 12 jan. 2019.

ZHANG, Y.; YUAN, Y.; LIANG, P.; ZHANG, Z.; GUO, X.; XIA, L.; ZHAO, Y.; SHU, X.; SUN, S.; YING, Y.; CHENG, Y. Overexpression of a novel candidate oncogene KIF14 correlates with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 28, p. 45459–45469, 2017. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget>. Acesso em: 11 jan. 2019.

ZHOU, J. D.; LIN, J.; ZHANG, T. J.; MA, J. C.; YANG, L.; WEN, X. M.; GUO, H.; YANG, J.; DENG, Z. Q.; QIAN, J. GPX3 methylation in bone marrow predicts adverse prognosis and leukemia transformation in myelodysplastic syndrome. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 267–274, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5269561/pdf/CAM4-6-267.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2019.

ZHOU, Q.; PENG, R. Q.; WU, X. J.; XIA, Q.; HOU, J. H.; DING, Y.; ZHOU, Q. M.; ZHANG, X.; PANG, Z. Z.; WAN, D. Sen; ZENG, Y. X.; ZHANG, X. S. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 13, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20141634>. Acesso em: 16 nov. 2018.

ZHOU, W.; WANG, Z.; SHEN, N.; PI, W.; JIANG, W.; HUANG, J.; HU, Y.; LI, X.; SUN, L. Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 398, n. 1–2, p. 11–19, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11010-014-2200-6.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2019.