

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2023.



**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 cólon com alta expressão de EGFL7.....	78
Tabela Suplementar 2: Genes diferencialmente expressos nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon com baixa expressão de EGFL7.....	94
Tabela Suplementar 3: Comparação entre as os genes diferencialmente expressos encontrados nos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon 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 cólon 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 cólon 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 cólon 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 cólon 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 cólon 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 ABREVIACÕES

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* (Proteína-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)

TMA = *Tissue microarrays*

TNM = Tumor, Linfonodo, Metástase

TP53 = *Tumor protein 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 consequentemente estão relacionados a maior recidiva.

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

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, Wullschlegel 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 Egfl 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 Egfl7 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 Egfl7 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. Egfl7, 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 Egfl7 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 Egfl7. *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. RTCGAToolbox: 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-Carlioni 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.