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 transcritoma 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 Aaparecida 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 saiamos 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 meu 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 transcritoma 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 algorótimo 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 – Indice de Densenvolvimento 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

TGFBR2 - 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

≥ - Maior ou igual a

≤ - Menor ou igual a

> - Maior que

< - Menor que

α – Alfa

β – Beta

γ - Gama

™ - 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 ultima 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 pais 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 transverso 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 musinosos, 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 estadios 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 colón 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 (KORNMANN 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 incialmente 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).

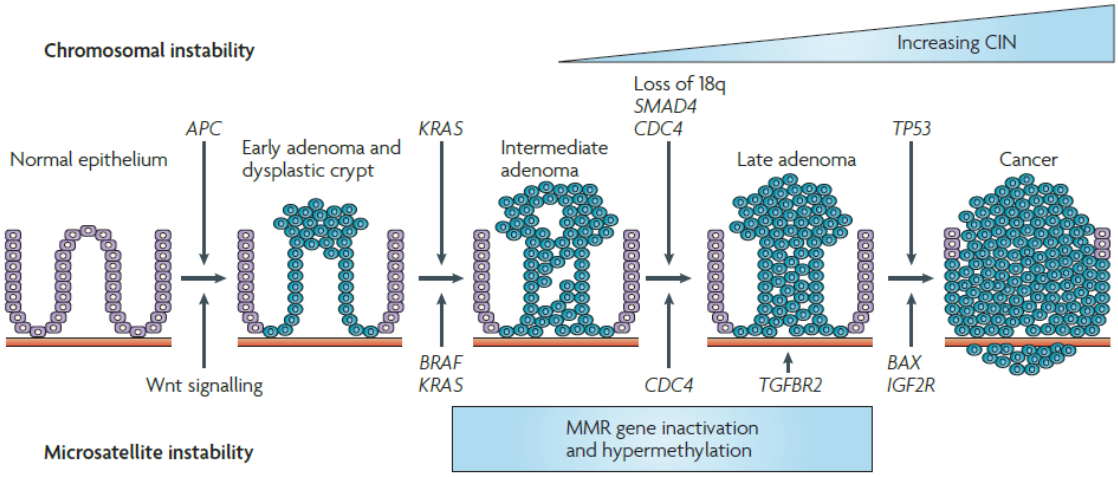

Figura 1. Modelo de progressão de adenoma a carcinoma no câncer colorretal.(Figura retirada de WALTHER et al., 2009)

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 aneuplodias e perdas de heterozigoses (LOH) e, consequentemente, 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, acumulo de mutações em genes com sequencias repetitivas como *TGFBR*2, *IGFR*2, *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 *TP5*3, 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 amplificações 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; MLECNIK 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 *naive* 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, imunofluorêscencia 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 analise 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 transcritoma.

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://githu b.com/ebech t/MCPcounter* (*Script* R)	BECHT et. al. 2016.
CIBERSORT	Vetor de suporte linear	22 populações imunes	*https ://ciber sort.stanf ord.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.

OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações moleculares no transcritoma amostras de adenocarcinoma de reto para identificar uma assinatura molecular e imunológica associada com progressão e metástase.

Objetivos Específicos

1. Identificar o perfil global de expressão de transcritos nos CR metastáticos e não metastáticos em comparação com os tecidos normais (N);

2. Identificar os subtipos CMS dos CR por meio de ferramentas de bioinformática.

3. Identificar genes candidatos e vias alteradas associados com a progressão metastática.

4. Validação dos dados com dados externos de adenocarcinoma de reto do TCGA (READ).

5. Testar diferentes algoritmos para estimar populações imunes infiltrantes do tumor utilizando dados do transcritoma do READ (TCGA).

6. Identificar o perfil imunológico de CR associado com a progressão metastática utilizando os algoritmos selecionados na etapa anterior.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes e obtenção dos tecidos

Foram obtidas amostras a fresco de câncer de reto (CR) de pacientes submetidos à biópsia ou cirurgia antes de qualquer terapia neoadjuvante e acompanhados no Hospital de Câncer de Barretos e no Hospital de Clínicas de Botucatu. Os pacientes foram avisados dos procedimentos e forneceram consentimento livre e esclarecido por escrito. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos de ambas as instituições (Pareceres nº 3.049.560 e nº 2.882.307, respectivamente). Os critérios diagnósticos e a classificação do tumor foram baseados nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Comitê Conjunto Americano sobre Câncer (AJCC) (AMIN et al., 2017; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2000). As amostras foram selecionadas baseadas nos seguintes critérios:

- *Critérios de inclusão*: tumores primários do subtipo adenocarcinoma de reto de qualquer estadiamento e grau histológico obtidos por biópsia ou ressecção cirúrgica de pacientes não tratados com quimioterapia e/ou radioterapia anteriormente à coleta das amostras.
- *Critérios de exclusão*: pacientes com histórico de tumores prévios ou sincrônicos e com história familial de CCR ou outras síndromes de cânceres hereditários; pacientes com ausência de dados clínicos, histopatológicos e de seguimento.

Para seleção das amostras de pacientes metastáticos (M) e não metastáticos (NM) foram consultados prontuários de cerca de 100 casos de CR registrados nos Bancos de Tumores do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP e do Hospital de Câncer de Barretos. Foram selecionados 29 casos de CR que atendiam aos critérios do estudo (Tabela 2). Duas amostras de tecidos retais normais confirmados histopatologicamente foram obtidas de autópsias e foram considerados como controles. Os pacientes do grupo NM apresentavam no mínimo 36 meses de seguimento a partir da coleta da amostra sem nenhuma evidência clínica e por exames de imagem de progressão da doença.

Processamento das amostras de tecido congelado

Tumor e tecidos normais foram macrodissecados para garantir pelo menos 80% das células epiteliais tumorais ou normais, respectivamente. O RNA total foi isolado utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante. A concentração de RNA foi medida por NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A integridade do RNA foi avaliada no kit Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 LabChip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Foram incluídas apenas amostras que apresentavam quantidade mínima de RNA de 100 ng/µl

Plataforma Clariom D Microarray

Para obter o perfil de expressão gênica das amostras de CR foi utilizado o Clariom D GeneChip® Whole Transcript (WT) Expression Arrays (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Esse kit permite a análise de mais de 540.00 transcritos detectando genes, splincing alternativo e RNAs longos não codificantes, O Kit de Reagente WT PLUS utiliza um método de transcrição reversa que prepara toda a extensão do RNA, incluindo RNA poli (A) e não-poli (A) para uma cobertura completa transcriptoma. O kit é composto de reagentes e um protocolo para preparar alvos prontos para hibridação utilizando de 50 a 500 ng de RNA total. O kit é otimizado para trabalhar com uma ampla gama de amostras, incluindo tecidos, células, linhas celulares e sangue total. As amostras de RNA total podem ser usadas diretamente sem a remoção do RNA ribossômico antes da preparação do alvo.

Tabela 2. Descrição das amostras de CR pré-selecionados para análise do transcritoma

ID	Status análise	Sexo	Idade	Estadio	Grupos	Seguimento (meses)	Tratamento adjuvante	Recidiva	Status	Data do óbito	Última informação
1	sem tumor	F	59	IIA	NM	67	sim	não	VSD	n/a	03/10/2018
2	incluído	M	62	III	M	30	sim	sim	OPC	12/08/2015	12/08/2015
3	material insuficiente	M	67	I	NM	41	não	não	VSD	n/a	27/06/2016
4	baixa qualidade RNA	F	55	IIA	NM	63	sim	não	VSD	n/a	09/06/2018
5	sem tumor	F	60	IV	M	29	n/a	n/a	OPC	16/09/2015	16/09/2015
6	sem tumor	M	67	IV	M	7	n/a	n/a	OPC	10/01/2014	10/01/2014
7	sem tumor	M	58	IV	M	45	n/a	n/a	OPC	14/01/2017	14/01/2017
8	incluído	F	67	IIA	NM	60	sim	não	VSD	n/a	24/04/2018
9	incluído	M	64	I	NM	66	não	não	VSD	n/a	17/10/2018
10	material insuficiente	M	61	II	M	7	sim	sim	OPC	10/04/2014	10/04/2014
11	incluído	M	68	IV	M	7	n/a	n/a	OPC	10/12/2013	10/12/2013
12	incluído	F	55	I	M	46	não	sim	VCD	n/a	03/01/2017
13	incluído	F	62	IIC	M	38	sim	sim	VSD*		18/05/2016
14	incluído	M	41	IIIC	M	33	sim	sim	OPC	23/02/2016	23/02/2016
15	incluído	F	51	IV	M	17	n/a	n/a	OPC	02/06/2016	02/06/2016
16	material insuficiente	M	80	IIC	NM	46	não	não	VSD	n/a	12/09/2018
17	incluído	M	84	I	NM	47	não	não	VSD	n/a	25/10/2018
18	material insuficiente	F	58	I	NM	42	não	não	VSD	n/a	22/05/2018
19	incluído	M	61	IIIB	M	13	sim	sim	OPC	07/11/2015	07/11/2015

20	baixa qualidade RNA	M	55	IV	M	16	n/a	n/a	OPC	24/09/2015	24/09/2015
21	incluído	F	62	IIA	NM	51	não	não	VSD		07/08/2018
22	incluído	M	71	IV	M	30	n/a	n/a	OPC	26/05/2017	26/05/2017
23	sem tumor	M	68	IIA	NM	43	não	não	VSD	n/a	12/06/2018
24	baixa qualidade RNA	M	50	IIIC	M	16	sim	sim	OPC	08/10/2016	08/10/2016
25	material insuficiente	M	77	IIA	M	27	não	sim	OPC	01/08/2017	01/08/2017
26	baixa qualidade RNA	M	61	IIIB	NM	36	sim	não	VSD	n/a	10/05/2018
27	incluído	F	69	IIIA	M	47	sim	sim	VSD*	n/a	31/10/2018
28	incluído	F	75	IIA	NM	41	não	não	VSD	n/a	19/07/2018
29	incluído	F	43	IV	M	10	sim	n/a	VCD	n/a	11/09/2018

NM – não metastático; M- metastático; n/a- não se aplica; VSD – vivo sem doença; VCD – vivo com doença; OPD – óbito pela doença; * Pacientes submetidos à cirurgia de resgate.

A preparação do cRNA, a hibridização das amostras e o escaneamento foram realizadas seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante, (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Resumidamente, o Affymetrix GeneChip WT Kit foi usado para preparação de cDNA e marcação com biotina. O cRNA foi purificado usando um protocolo de esferas magnéticas da Affymetrix. O kit Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash and Stain foi usado para processamento dos arrays. Os arrays foram incubadas durante 16 h no forno de hibridação Affymetrix GeneChip 645 a 45° com rotação a 60 rpm. Os chips foram então escaneados com o Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Foi realizada uma pré-análise dos dados brutos foram analisados usando o software Transcriptome Analysis Console 4.0.1.36 (TAC) todas as amostras passaram nos três controles de qualidade do TAC.

Análise dos dados

Os arquivos de dados de perfil de expressão gênica (*.CEL) gerados pelo Affymetrix GeneChip Scanner 3000 foram normalizados pelo método RMA usando o pacote R disponível no Bioconductor oligo: Preprocessing tools for oligonucleotide arrays package. (CARVALHO; IRIZARRY, 2010).

Os perfis de expressão das amostras de CR obtidas de 15 pacientes foram utilizados para identificar as assinaturas moleculares que foram correlacionadas com o estágio patológico, o marcador prognóstico atualmente utilizado em CR. Para identificar uma assinatura associada à metástase, selecionamos dois grupos de pacientes: grupo metastático (M, N=10) composto por pacientes com metástase ao diagnóstico (M1, N=4) ou que desenvolveram metástase durante o seguimento (N=6); e grupo não metastático (NM, N=5), pacientes com boa evolução clínica, sem evidência de doença por pelo menos 36 meses após a cirurgia (média de 53 meses, variação de 41 a 66 meses) (Tabela 3).

Tabela 3. Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes com câncer de reto

Variáveis	**CR** **N=15 (%)**	**READ** (TCGA) **N=40 (%)**
Idade (Anos)		
Média (DP)	62 (11.5)	65
Follow-up (meses)		
Mediana (min-max)	49 (7-66)	26 (0.5-131)
Sexo		
Masculino	7 (46.7)	17 (42.5)
Feminino	8 (53.3)	23 (57.5)
Tamanho Tumoral (T)		
T1	1 (6.7)	2 (5.0)
T2	1 (6.7)	4(10.0)
T3	8 (53.3)	29 (72.5)
T4	5 (33.3)	4 (12.5)
NA	-	1 (2.5)
Estatus de Linfonodos		
Positivo (N1)	7 (46.7)	21 (52.5)
Negativo (N0)	8 (53.3)	18 (45.0)
Indeterminado (Nx)	-	1 (2.5)
Metástase a Distância		
Positivo (M1)	4 (26.7)	6 (15.0)
Negativo (M0)	11 (73.3)	30 (75,0)
Indeterminado (Mx)	-	4 (10.0)
Estadio		
I	3 (20)	4 (10)
II	4 (26.7)	14 (35)
III	4 (26.7)	15 (37.5)
IV	4 (26.7)	6 (15)
ND	-	1 (2.5)
Metástase ao Seguimento	6 (40)	NA
Óbito por Câncer	6 (40)	8 (20)

A análise dos genes diferencialmente expressos foi feita usando o pacote limma (Modelos Lineares para Microarray Data versão 3.9.19) disponível para o programa R (RITCHIE et al., 2015). Foram considerados como diferencialmente expressos os genes que apresentavam fold-change (FC) ≤-2 ou ≥2 e $p < 0,05$; os genes diferencialmente expressos foram, posteriormente, utilizados no enriquecimento de vias e análises de redes.

Para identificar as funções biológicas dos genes diferencialmente expressos e separá-los em grupos funcionalmente relacionados, utilizamos a plataforma *The Gene Ontology Consortium* (GO) (ASHBURNER et al., 2000; MI et al., 2017; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017), que é amplamente utilizada na pesquisa biomédica. O GO é capaz de descrever a função de um gene a partir da identificação de três caraterísticas: função molecular (atividades realizadas em nível molecular pelos produtos gênicos), componente celular (localização relativa a estruturas celulares onde os produtos gênicos desempenham funções) e processo biológico ("programa biológico" efetuado por múltiplas atividades moleculares).

A plataforma GenePattern (*https://cloud.genepattern.org/*) foi utilizada para duas abordagens de análises: 1) Análise de agrupamento hierárquico com os genes obtidos nas análises entre grupos (distância entre grupos avaliada por correlação de Pearson) utilizando o módulo *Hierarchical Clustering* (v6)(DE HOON et al., 2004; EISEN et al., 1998). 2) visualização dos resultados em dendograma com o módulo *Hierarchical Clustering Image.*

A identificação de vias biológicas foi realizada com o enriquecimento dos genes diferencialmente expressos selecionados no estudo. Foi utilizado o pacote enrichr (KULESHOV et al., 2016) considerando os bancos de dados KEGG e REACTOME, bem como um $p < 0,05$.

Validação dos resultados com dados do TCGA

O perfil de expressão gênica das amostras de câncer de reto do TCGA foi obtido de dados normalizados de RNA-seq (V2) através do banco de dados UCSC Xena (*http://xena.ucsc.edu*). Foram consideradas 105 amostras disponíveis para adenocarcinoma de reto (TCGA-READ). Foram excluídas as amostras de tumores que apresentavam histologia diferente de adenocarcinoma usual; tumores não primários (recorrência local); tumores oriundos de outro sítio anatômico que não reto; casos que apresentavam tumores sincrônicos e que não tinham dados de RNA-seq. Sendo assim, 40 casos de adenocarcinoma de reto foram incluídos nas análises (Tabela 3). Quatro tecidos normais adjacentes (TN) que foram utilizados como controles.

Para análise dos grupos metastáticos e não metastáticos, devido a ausência de informações de desenvolvimento de metástase a distância durante o seguimento clínico dessas amostras, para fins de comparação, foram considerados como pacientes metastáticos aqueles com metástase ao diagnóstico; e pacientes não metastáticos (NM) aqueles com tumores estadio I e II, por apresentarem menor chance de desenvolver metástases durante a evolução clínica comparados aos tumores com estadio III.

Classificação dos "consensus molecular subtypes" (CMS) das amostras de câncer de reto

A classificação CMS foi realizada nas amostras do TCGA e nas amostras de CR da nossa casuística, utilizando o algoritmo CMScaller descrito por Eide et al. (2017) O CMScaller está disponível como um pacote R (https://github.com/Lothelab/CMScaller)(EIDE et al., 2017).

Identificação do perfil imunológico

Para identificar quais os melhores algoritmos se adequam ao nosso estudo para identificação do perfil imunológico e sua associação com características de pior prognóstico nos tumores, os dados do TCGA foram utilizados para identificação das subpopulações de células imunes infiltrantes em cada um dos grupos amostrais, utilizando cinco algoritmos de predição: TIMER (LI et al., 2017), MCP-counter (BECHT et al., 2016b), xCell (ARAN; HU; BUTTE, 2017), EPIC (RACLE et al., 2017) e CIBERSORT (NEWMAN et al., 2015).

O algoritmo TIMER ("*Tumor Immune Estimation Resource*") (*http://cistrome.org/TIMER/*) é uma ferramenta que avalia o impacto clínico de seis diferentes células imunes (células B, células T CD4++, células T CD8+, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) em diversos tipos de cânceres. A estimativa do infiltrado imune no conjunto de amostras de adenocarcinoma de reto (TCGA) foi obtida a partir do módulo *Estimation* da plataforma. Os genes selecionados são correlacionados negativamente com a pureza tumoral (porcentagem de células malignas no tecido tumoral) para cada tipo de câncer e aplica o método dos quadrados mínimos aos níveis de expressão dos genes de interesse para predizer a abundância dos seis subtipos de células imune.

MCP-counter ("*Microenvironment Cell Populations-counter*") (*http://cit.ligue-cancer.net/language/en/mcp-counter/*) é um pacote do R capaz de predizer a abundância de 10 populações celulares (células T CD3+, células T CD8+, células T citotóxicas, células NK, células B, células originadas de monócitos, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos) a partir do perfil de transcrição de tecidos humanos. Cada amostra é avaliada individualmente gerando escores independentes que são utilizados para comparações diretas de abundância de cada tipo celular em dados de tecido normal. O método do MCP-counter se baseia em marcadores transcritômicos, características da expressão gênica presentes em apenas uma de cada uma das populações celulares, abundância desses marcadores e é diretamente proporcional à quantidade de células de interesse.

xCell (*http://xCell.ucsf.edu/*) é uma plataforma que se baseia em ssGSEA para inferir as populações de 64 tipos de células imunes e estromais, incluindo células de resposta imune adaptativa e inata, células hematopoiéticas, células epiteliais e células da matriz extracelular. Para determinar o *escore* de abundância de cada tipo celular nas amostras, o xCell parte de um compêndio de 489 conjuntos de genes extraídos de diferentes estudos de larga escala; o *escore* de abundância é determinado em quatro passos: (1) utilização do ssGSEA para cada uma das assinaturas gênicas, (2) cálculo da média dos *escores* para cada tipo celular (o resultado é uma matriz de 64 linhas e N colunas), (3) transformação de cada elemento da matriz como descrito em Aran D *et al.* 2017 e (4) compensação de "*spillover*" utilizando o método dos quadrados mínimos para evitar que o ES de uma célula interfira com o de células semelhantes.

CIBERSORT (*cell-type identification by estimating relative subsets of RNA transcripts*) (*http://cibersort.stanford.edu/*) é um método para caracterização da composição de tecidos complexos a partir do perfil de expressão gênica que é utilizado para estimar as proporções relativas de cada população celular de interesse. A plataforma aplica um vetor de suporte linear (*linear support vector regression – SV*R), que utiliza técnicas de aprendizado de máquina para diminuir os sinais de interferência nas análises. Foi usado como referência o arquivo LM22, disponibilizado pelo próprio CIBERSORT, que contém a assinatura gênica de 22 tipos de células imunes (derivadas de dados de *microarray* de células imunes humanas). Os arquivos das amostras ("*mixture file*") utilizados foram os perfis gênicos totais dos grupos amostrais e as análises realizadas com 1.000 permutações e normalização de quantil desativada, conforme recomendação dos desenvolvedores. Os resultados das análises foram filtrados pelo valor de p ($p \leq 0,05$).

O algoritmo EPIC é projetado para estimar as frações de células imunológicas e cancerígenas a partir de dados de expressão gênica de tumores. Isto é feito ajustando perfis de referência de expressão gênica dos principais tipos de células não malignas e simultaneamente representando um tipo de célula não caracterizado sem conhecimento prévio sobre o mesmo (e.g., células de câncer em amostras de tumores sólidos). Os perfis de

expressão de genes de referência derivados dos principais tipos de células de infiltrado tumoral (i.e. subconjuntos imunes, células estromais e endoteliais). Os resultados obtidos com cada algoritmo foram tabulados e comparados, para identificar as vantagens e desvantagens de cada um.

CAPÍTULO I

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Capítulo I estão apresentados e discutidos os resultados dos testes com os diferentes algoritmos de predição de células infiltrantes do tumor utilizando dados do transcritoma do TCGA. Além disso, também estão mostrados os resultados da classificação dos subtipos moleculares CMS nos dados do TCGA e nos dados de CR da nossa casuística.

Os resultados dos transcritoma e do perfil imunológico do CR estão apresentados no Capítulo II no formato de manuscrito em fase de preparação. Vale ressaltar que a casuística será aumentada para um N total de 26 casos de CR, que serão avaliados na plataforma Clariom D. Além disso, os genes candidatos selecionados ao final das análises e validados no TCGA serão testados em grupo independente de amostras de arquivo de CR pelo método Nanostring, uma tecnologia digital de detecção direta de moléculas mutiplexadas. Essas análises serão incluídas no manuscrito.

Algoritmos de Predição do Perfil Imune

Considerando o limitado número de casos de CR da nossa casuística, optamos por utilizar os dados do TCGA para testar os diferentes algoritmos para estimar as células do sistema imune infiltrantes do tumor e identificar suas vantagens e desvantagens.

Dentre as cinco plataformas testadas, resultados significativos foram obtidos para quatro plataformas: xCell, MCP-counter, TIMER e EPIC. Por outro lado, não foi possível obter resultados com significância estatística utilizando a plataforma CIBERSORT, devido ao número reduzido de amostras (N=40). Rohr-Udilova et al. (2018) reportaram a composição de células imunes em hepatocelular carcinoma utilizando CIBERSORT, no entanto, foram utilizadas nas análises 41 tecidos normais de fígado, 305 tumores e 82 tecidos adjacentes (ROHR-UDILOVA et al., 2018). Em CCR, avaliando dados públicos de dois estudos, incluindo TCGA, totalizando mais de 2000 amostras,

CIBERSORT foi capaz de identificar que tumores com ausência de macrófagos M1 ou com aumento de macrófagos M2, eosinófilos e neutrófilos estavam associados com pior prognóstico (XIONG et al., 2018). Aparentemente, este algoritmo foi desenvolvido para estudos com grande número de amostras. Então, apesar de ser citado por vários artigos e apresentar uma boa correlação dos seus resultados com os dados celulares obtidos nas análises no tecido tumoral, uma das limitações da utilização da plataforma CIBERSORT é o número amostral.

Os resultados das plataformas xCell, MCP-counter e TIMER são expressos em escores, e é importante ressaltar que estes escores não podem ser interpretados como frações celulares. Os resultados gerados de cada plataforma são de fato escores de enriquecimento gerados a partir da comparação de perfil de expressão das amostras com os conjuntos de dados de cada plataformas e não podem ser utilizados para comparações entre tipos celulares apenas entre amostras. Desta forma, não é possível inferir que uma população está mais representada que outra população numa determinada amostra, mas que uma população está mais enriquecida na amostra A que na amostra B. Assim, em nossas análises comparamos cada população de células entre os grupos M1 e M0.

A partir dos resultados obtidos pelo algoritmo xCell selecionamos as populações celulares diretamente relacionadas com o sistema imune e relevantes para a carcinogênese (Tabela 4). É possível notar uma diminuição dos escores de várias populações celulares tanto de imunidade inata quanto adaptativa nos tumores metastáticos (M1) em comparação com M0, como TCD8, TCD4 de memória, linfócitos Th1 e Th2, células NK e NKT, entre outras. Notadamente, observamos uma diminuição marginalmente significativa de macrófagos nos tumores M1 comparada a M0 (p=0,06, Figura 2). Em concordância com nossos resultados, Zhou et al. detectaram menor densidade de macrófagos associada com metástases hepáticas em CRC (ZHOU et al., 2010). Não foram observadas diferenças significativas entre as demais populações celulares entre M1 e M0. Interessantemente, células da linhagem B (linfócitos B e principalmente linfócitos B de memória) mostraram um aumento nos tumores M1 comparado a M0 (Figura 2 e Tabela 4), porém não

estatisticamente significativo. No estudo de Berntsson et al. aumento da densidade de linfócitos B CD20+ nos tumores foi associado com melhor prognóstico em tumores de cólon direito, mas não em cólon esquerdo e reto (BERNTSSON et al., 2017).

É interessante analisar o ImmuneScore, um escore gerado para cada amostra a partir da soma das populações células B, T CD4+, T CD8+, dendríticas, eosinófilos, macrófagos, monócitos, mastócitos, neutrófilos e NK. A partir do ImmunoScore é possível observar mais facilmente as diferenças de infiltrados celulares entre os grupos amostrais. O ImmnuneScore gerado pelo xCell já vem sendo estudado como um novo fator de predição do prognóstico de pacientes de câncer de mama e pulmão. Um estudo realizado com pacientes com tumores de mama HER2+ observou ausência de células imune infiltrantes nas regiões invasivas dos tumores dos pacientes que foram a óbito, relacionando um ImmuneScore baixo com pior prognóstico (SALMEN et al., 2018). O estudo de *Choi et al.* dividiu as amostras de adenocarcinoma de pulmão em 4 clusters de acordo com a similaridade dos perfis de células imunes, os grupos com maior ImmuneScore reuniram as amostras de melhor prognóstico; e após análise multivariada, o ImmuneScore foi identificado como um marcador preditivo de prognóstico independente de outras características clínicas (CHOI; NA; KWON JOONG NA, 2018). Nas nossas análises não foi observada diferença significativa entre os valores de ImmuneScore entre amostras do grupo M1 e M0 (Figura 2).

Apesar do perfil imune gerado pelo TIMER ser composto de apenas seis populações celulares (Tabela 5) ele já foi relacionado à expressão da proteína S100A4, uma proteína que estimula a produção de citocinas pró-infamatórias em células de câncer de mama, os níveis de expressão da proteína se correlacionaram positivamente com scores de células T, células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (PRASMICKAITE et al., 2018). Apesar do maior infiltrado de células imunes ter sido relacionado com a presença de citocinas pró inflamatórias que promoverem um ambiente pró tumoral, a maior presença de células imunes poderia ser um indício de modulação de sistema imune para gerar o escape tumoral do sistema imune (GRASSO et al., 2018).

Tabela 4. Médias dos escores de enriquecimento resultantes da análise de populações de células infiltrantes nas amostras N, M0 e M1 obtidas pela plataforma xCell.

Populações Celulares	**N**	**M0**	**M1**	**M1/M0**
Células B	0,904	0,382	0,352	0,921
Células B de Memória	0,000	0,011	0,033	3,000
Basófilos	0,005	0,073	0,066	0,904
T CD4+	0,206	0,196	0,144	0,735
T CD4+ de memória	0,054	0,072	0,027	0,375
T CD8+	0,185	0,133	0,074	0,556
Células Dendríticas	0,149	0,041	0,022	0,537
Dendrítica ativada (aDC)	0,081	0,074	0,022	0,297
Dendrítica convencional (cDC)	0,052	0,055	0,019	0,345
Dendrítica imatura (iDC)	0,077	0,053	0,026	0,491
Dendrítica plasmocitária (pDC)	0,142	0,067	0,064	0,955
Eosinófilos	0,225	0,082	0,100	1,220
Macrófagos	0,263	0,012	0,015	1,250
Macrófagos M1	0,023	0,031	0,005	0,161
Macrófagos M2	0,316	0,136	0,046	0,338
Mastócitos	0,067	0,079	0,114	1,443
Monócitos	0,155	0,098	0,070	0,714
Células NK	0,137	0,775	0,789	1,018
Linfócitos NKT	0,039	0,059	0,031	0,525
Neutrófilos	0,784	0,721	0,487	0,675
Plasmócitos	1,043	0,497	0,333	0,670
T-*helper* 1	1,149	0,481	0,370	0,769
T-*helper* 2	0,095	0,067	0,060	0,896
Células Endoteliais	0,115	0,083	0,227	2,735
*ImmuneScore**	1,249	0,771	0,649	0,842
*StromaScore***	0,525	0,248	0,243	0,980
*MicroenvironmentScore****	1,774	1,019	0,892	0,875

*Média da soma das populações de células B, T CD4+, T CD8+, Dendríticas, Eosinófilos, Macrófagos, Monócitos, Mastócitos, Neutrófilos e NK **Média da soma das populações de Adipócitos, Células Endoteliais e Fibroblastos ***Média de soma dos Scores Imune e Stromal.

Tabela 5. Médias dos escores das populações de células infiltrantes nas amostras M0, M1 e N obtidas pela plataforma TIMER.

Populações Celulares	N	M0	M1	M1/M0
Células B	0,191	0,12	0,113	0,942
Células T CD4+	0,128	0,141	0,153	1,085
Células T CD8+	0,274	0,201	0,179	0,891
Neutrófilos	0,121	0,126	0,127	1,008
Macrófagos	0,108	0,077	0,07	0,909
Células Dendríticas	0,607	0,522	0,492	0,943

Os resultados do MCP-counter são gerados a partir da comparação das amostras do estudo com o banco de dados de amostras normais. Assim, para analisar os resultados deve-se assumir o tecido normal como zero (0); escores negativos indicam que a população celular está menos representada na amostra em estudo quando comparada ao tecido normal, já escores positivos indicam uma maior presença da população no tecido estudado (BECHT et al., 2016b). O perfil imune gerado pelo MCP-counter é composto de oito populações celulares (Tabela 6). Com esse algoritmo é possível observar alterações até mesmo nos tecidos normais adjacentes que apresentam um infiltrado imune superior a um tecido normal. Semelhantemente ao que foi observado com o algoritmo xCell, onde observa-se maior escore de células B nos tumores M1 comparado aos M0, porém sem significância estatística (Tabela 8, Figura 2). Por outro lado, observa-se redução de células imune infiltradas nos tumores metastáticos, principalmente de linfócitos T CD8 (Tabela 6, Figura 2).

Tabela 6. Médias dos escores de enriquecimento resultantes da análise de populações de células infiltrantes nas amostras M0, M1 e N obtidas pela plataforma MCP-counter.

Populações Celulares	N	M0	M1	M1/M0
Células T	-0,397	-1,314	-1,514	1,152
Células T CD8+	2,743	-1,617	-1,581	0,978
Células NK	2,993	-0,293	-0,613	2,090
Células B	2,858	-0,327	0,035	-0,108
Células Dendríticas	2,519	-0,467	-0,628	1,346
Neutrófilos	5,725	0,625	0,475	0,760
Células Endoteliais	0,346	-0,738	-0,264	0,358
Fibroblastos	2,261	0,885	0,525	0,593

O MCP-counter já foi utilizado para caracterizar o perfil imune de tumores colorretais separados em grupos de acordo a presença ou ausência de instabilidade de microssatélites. Observou-se no grupo com estabilidade de microssatélites (MSS) que grande parte não tinha infiltração de células T, o que estava altamente relacionado com a alta taxa de mutação em *WNT* encontrada nesse grupo, que aumentam a sinalização da via *WNT* e iniba a infiltração de células imunes. (GRASSO et al., 2018).

Dentre as plataformas utilizadas nesse trabalho EPIC é a única plataforma cujos resultados são frações celulares tornando possível a comparação dos resultados dos diferentes tipos celulares dentro de uma amostra (RACLE et al., 2017). Os resultados dos outros algoritmos se repetem nos resultados gerados pelo EPIC observando-se diminuição em os tipos celulares imunes com exceção de células B, células NK e células endoteliais na comparação entre M0 e M1 (Tabela 7, Figura 2). Interessantemente, dentre essas populações celulares a única que apresentou uma tendência de

associação significativa foi a população de células B (p=0,07, Figura 2) concordante com os achados do algoritmo xCell.

Tabela 7. Médias das porcentagens das populações celulares resultantes da análise de populações de células infiltrantes nas amostras M0, M1 e N obtidas pela plataforma EPIC.

Populações celulares	**N**	**M0**	**M1**	**M1/M0**
Células B	1,22%	2,54%	7,90%	3,113
Fibroblastos Associados com Câncer	0,05%	0,52%	0,61%	1,162
Células T CD4+	11,40%	19,59%	13,52%	0,690
Células T CD8+	11,93%	2,56%	0,00%	-
Células Endoteliais	1,17%	10,10%	18,81%	1,862
Macrófagos	0,26%	1,65%	1,01%	0,608
Células NK	0,93%	10,02%	12,63%	1,260
Outras Células	73,03%	53,02%	45,54%	0,859

Apesar do perfil de cada algoritmo ser composto por diferentes tipos celulares, nas populações celulares comuns é possível perceber uma tendência de diminuição do infiltrado de células imunes (Tabela 8, Figura 2). Os algoritmos que se provaram mais eficientes em nossas análises foram xCell e EPIC. Uma desvantagem do TIMER é analisar um numero reduzido de populações celulares, como fibroblastos e células endoteliais diferente dos outros algoritmos. Além disso, também não foi capaz de identificar diferenças entre os grupos metastáticos e não metastáticos.

xCell é um algoritmo que avalia o maior número de populações celulares imunes e não imunes sendo capaz, inclusive, de detectar subpopulações como células B de memória, macrófagos M1 e M2, Células dendríticas ativas, imaturas, convencionais e plasmocitárias (Tabela 4, Figura 2). Permitindo uma melhor compreensão do papel das células imune na progressão tumoral, porém sua principal desvantagem é o método utilizado

para o cálculo dos escores. Por utilizar apenas o método ssGSEA impossibilita a comparação dos escores entre os tipos celulares (ARAN; HU; BUTTE, 2017). Ainda que os escores tenham sido mostrados com alta correlação com as frações celulares reais é aconselhável o xCell seja complementado com um algoritmo de análise que gere frações celulares como é o caso do EPIC.

EPIC é dos únicos algoritmos disponíveis cujos resultados podem ser interpretados como frações celulares, seus resultados apresentaram alta correlação com análises de citometria de fluxo (RACLE et al., 2017). EPIC permite a análise da presença de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células endoteliais, permitindo a observação de populações relacionadas com a angiogênese, um processo fundamental na carcinogênese, porém o algoritmo não avalia subpopulações celulares, como por exemplo, células B de memória abrindo margem para possíveis interpretações erradas de seus resultados, pois é esperado que as células B de memória aumentem ao longo de tempo, e o score apresentado pelo algoritmo reúne todos os tipos celulares B. Esse problema também é encontrado na plataforma MCP-counter que também não avalias as células B de memória separadamente. Os linfócitos T CD4+ também não são avaliados separadamente. Porém, a principal vantagem do MCP-counter é a composição de seu banco de dados. Composto apenas por perfis de expressão de tecidos e culturas celulares saudáveis, o algoritmo permite a comparação das amostras com dados de amostras normais, dados esses muitas vezes de difícil obtenção devido a questões éticas (BECHT et al., 2016b).

Tabela 8. Comparação dos perfis imunes gerados das plataformas xCell, TIMER, EPIC e MCP-counter.

	xCell				**TIMER**				**EPIC**				**MCP-counter**			
	N	M0	M1	M1/M0	N	M0	M1	M1/M0	N	M0	M1	M1/M0	N	M0	M1	M1/M0
Células B	0,9	0,31	0,35	1,154	0,19	0,12	0,11	0,942	0,01	0,03	0,08	3,16	2,86	-0,33	0,035	-0,107
T CD4+	0,01	0,08	0,07	0,795	0,13	0,14	0,15	1,085	0,11	0,20	0,14	0,711	NA	NA	NA	NA
T CD8+	0,05	0,08	0,03	0,36	0,27	0,2	0,18	0,891	0,12	0,03	0	0	2,74	-1,62	-1,58	0,978
Neutrófilos	0,07	0,08	0,11	1,407	0,12	0,13	0,13	1,008	NA	NA	NA	NA	5,73	0,625	0,475	0,76
Macrófagos	0,08	0,07	0,02	0,301	0,11	0,08	0,07	0,909	0	0,02	0,01	0,625	NA	NA	NA	NA
Células Dendríticas	0,19	0,13	0,07	0,587	0,61	0,52	0,49	0,943	NA	NA	NA	NA	2,52	-0,47	-0,63	1,345
NK	0,14	0,78	0,79	1,018	NA	NA	NA	NA	0,01	0,1	0,13	1,299	2,99	-0,29	-0,61	2,092
Células Endoteliais	0,11	0,08	0,22	0,115	NA	NA	NA	NA	0,01	0,10	0,19	1,924	0,35	-,074	-0,26	0,358

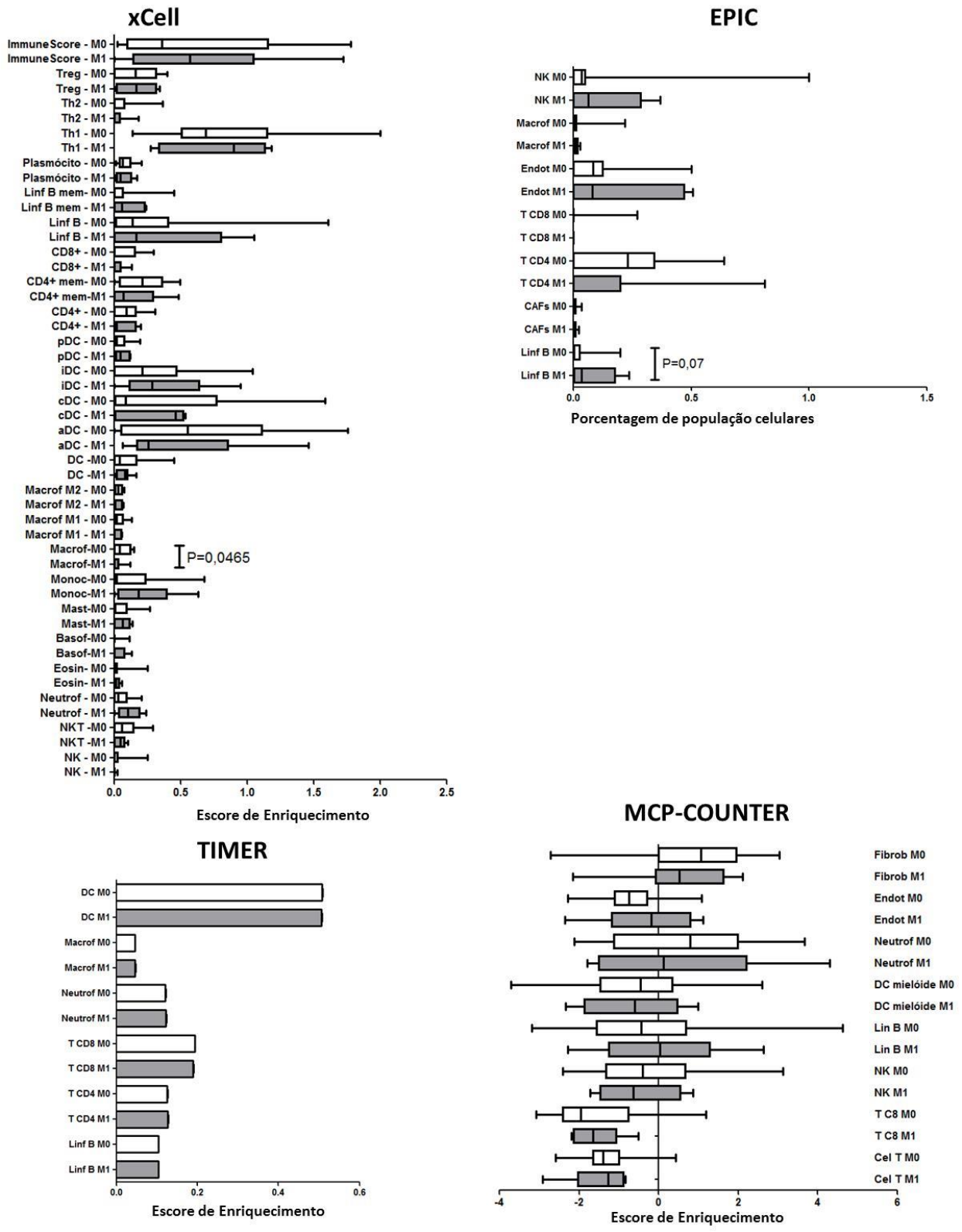

Figura 2. Gráficos mostrando as distribuições das populações celulares entre os tumores M1 e M0 identificadas pelos algoritmos xCell, EPIC, TIMER e MCP-Counter. Teste de Mann-Whitney.

Após testar os cinco algoritmos, três apresentaram potencial para serem utilizados nas nossas análises dos dados dos CR: MCP-counter, EPIC e xCell. Já existem dados na literatura mostrando que esses algoritmos geram resultados com alta correlação com métodos tradiconais como citometria de fluxo e imunohistoquímica(FINOTELLO; TRAJANOSKI, 2018). Ainda que o MCP-counter e EPIC sejam mais limitados quanto ao número de populações analisadas quando comparados a outros algoritmos, eles permitem a análises de células não-imunes, como fibroblastos, que tem um papel fundamental na carcinogênese (FINOTELLO; TRAJANOSKI, 2018). Além disso, os resultados gerados pelo MCP-counter também já foram mostrados estar correlacionados possitivamente com os subtipos CMS do CCR (BECHT et al., 2016).

No entanto, a plataforma EPIC foi desenvolvida para dados de RNAseq e quando testamos esse algortimo nos dados obtidos com a plataforma Clariom D (microarray), não obtivemos resultados. Da mesma forma, quando testamos a plataforma MCP-counter com os dados obtidos com nossas amostras de CR na mesma plataforma, não conseguimos resultados. A assinatura de 111 genes do MCP-couter foi obtida com base nos dados do TCGA, assim, uma possível explicação é que tenha menor compatibilidade com outras plataformas e anotações. Assim, as análises dos dados de CR foram realizadas apenas com o algortimo xCell (Capítulo II).

Classificação CMS

Considerando que a classificação CMS tem sido associada com prognóstico dos CRC, realizamos a análise do subtipo CMS na nossa casuística de CR e nas amostras do TCGA (Tabela 9). No grupo de amostras do TCGA, 7 amostras foram classificadas como subtipo CMS1 (18%), 17 como CMS2 (43%), 3 como CMS3 (8%) e 8 como CMS4 (20%). Em cinco amostras, não foi possível a classificação do subtipo molecular. A distribuição dos subtipos moleculares é semelhante ao descrito na literatura. Estudo recente avaliando cerca de 600 amostras de CCR, das quais 104 eram CR, mostrou que 56% destes tumores eram CMS2 (canônico), seguido de 27% CMS4, 13% CMS3 e 4% CMS1 (LOREE et al., 2018).

Com relação às amostras de CR da nossa casuística, devido ao pequeno número amostral, não foi possível obter resultados com significância estatística para classificação CMS em nenhuma das amostras testadas (Tabela 9). Infelizmente, esta é umas limitações do algoritmo, e por este motivo não foi possível classificar nossas amostras para os subtipos moleculares CMS. Esperamos que com o aumento da casuística, seja possível realizar a classificação CMS nos nossos casos de CR.

Tabela 9. Classificação CMS das amostras de câncer de reto.

CR				READ (TCGA)			
Identificação	**Predição**	**p-valor**	**FDR**	**Identificação**	**Predição**	**p-valor**	**FDR**
M12	CMS1	0.2647	0.6429	T2	CMS1	0.0010	0.0017
M27	CMS1	0.4895	0.8970	T6	CMS1	0.0010	0.0017
NM21	CMS1	0.1149	0.3255	T11	CMS1	0.0060	0.0084
M2	CMS2	0.9960	0.9980	T17	CMS1	0.0300	0.0385
M22	CMS2	0.7243	0.9471	T19	CMS1	0.0070	0.0095
M29	CMS2	0.9061	0.9980	T24	CMS1	0.0020	0.0031
NM8	CMS2	0.9980	0.9980	T35	CMS1	0.0020	0.0031
NM9	CMS2	0.6603	0.9355	T1	CMS2	0.0010	0.0017
NM17	CMS2	0.5804	0.8970	T3	CMS2	0.0010	0.0017
NM28	CMS2	0.0210	0.0892	T4	CMS2	0.0010	0.0017
M11	CMS3	0.4945	0.8970	T7	CMS2	0.0010	0.0017
M14	CMS3	0.9880	0.9980	T10	CMS2	0.0010	0.0017
M15	CMS3	0.0509	0.1732	T13	CMS2	0.0010	0.0017
M19	CMS3	0.5445	0.8970	T15	CMS2	0.0010	0.0017
M13	CMS4	0.0020	0.0113	T16	CMS2	0.0010	0.0017
				T18	CMS2	0.0010	0.0017
				T20	CMS2	0.0010	0.0017
				T21	CMS2	0.0010	0.0017
				T23	CMS2	0.0010	0.0017
				T25	CMS2	0.0050	0.0073
				T26	CMS2	0.0010	0.0017
				T28	CMS2	0.0010	0.0017
				T36	CMS2	0.0210	0.0278
				T40	CMS2	0.0010	0.0017
				T34	CMS3	0.0010	0.0017
				T37	CMS3	0.0020	0.0031
				T39	CMS3	0.0010	0.0017
				T5	CMS4	0.0010	0.0017
				T9	CMS4	0.0030	0.0045
				T12	CMS4	0.0010	0.0017
				T14	CMS4	0.0010	0.0017
				T22	CMS4	0.0010	0.0017
				T27	CMS4	0.0010	0.0017

T32	CMS4	0.0010	0.0017
T33	CMS4	0.0010	0.0017
T8	NA	0.0440	0.0535
T29	NA	0.0420	0.0524
T30	NA	0.7802	0.8165
T31	NA	0.1858	0.2090
T38	NA	0.8182	0.8368

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

ABREU, M. H.; MATOS, E.; POÇAS, F. C.; ROSA, R.; JORGE, P. Rectal 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.; GASPAR, 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.

ASPORD, 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.; SAUTÏS-FRIDMAN, C.; FRIDMAN, W. H.; DE REYNIÏS, 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.bjcancer.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.

CARMELIET, 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.; ZINZINDOHOUÉ, 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: <%5C%5Cgbkenpfsphg0001%5CResolute%5CDATA%5CPurpleHat%5Cclients.ph%5CMerckSerono%5CAdmin%5CReferences%5CCRC%5CGuinney et al. Nature Medicine 2015_CMS.pdf>

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 I, 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 SystemInternational 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.; KRUHØFFER, 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.; KOBA, 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.

KORNMANN, 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, M. G.; MONTEIRO, C. D.; GUNDERSEN, G. W.; MA'AYAN, A. Enrichr: 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%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27111410>

MAURER, C. A.; RENZULLI, P.; KULL, C.; KÄSER, S. A.; MAZZUCCHELLI, 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.; MADDOX, 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.; PAULOS, C. M.; RUBINSTEIN, M. P.; WRANGLE, J.; CAMP, E. R. 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.

TABERNERO, 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.; CEHELSKY, 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.; CIARDIELLO, F.; D'HOORE, 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.; ZAANAN, 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.; COLLISSON, 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.

CAPÍTULO II

MANUSCRIPT DRAFT

Transcriptome profiling reveals potential biomarkers and immune escape mechanisms associated with metastatic progression in rectal adenocarcinoma.

Iael W. Minutentag[1], Fábio A. Marchi[2], Marcio de Carvalho[3], Cristiano de P. Souza[4], Rui M. V. Reis[5], Marcelo P. T de Moraes[6], Patricia P. dos Reis[1], Silvia R. Rogatto[7], Sandra A. Drigo[1, 3].

1 São Paulo State University (UNESP), Medical School, Botucatu, Department of Surgery and Orthopaedics
2 International Research Centre (CIPE), A.C. Cancer Center, São Paulo
3 São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu
4 Barretos Cancer Hospital, Barretos.
5 Molecular Oncology Research Center (CPOM), Barretos Cancer Hospital, Barretos.
6 São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu, Department of Pathology
7 Institute of Regional Health, University of Southern Denmark. DK and Vejle Hospital, Denmark.

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 compared to the NM 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 decrease in T regulatory (Treg) cells in M tumours, can play a role in immune escape 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

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common tumour in the world and the second cause of death by cancer. Approximately 1.8 million new cases of CRC are expected worldwide (FERLAY et al., 2018; NG et al., 2013). Rectal cancer (RC) accounts for one-third of CRC cases and its incidence is predicted to increase further in both genders (GLYNNE-JONES et al., 2017).

Over the last decades, the reduction of local recurrence in RC has been achieved by the introduction of total mesorectal excision and neoadjuvant chemoradiation therapy. Nonetheless, no significant improvement has been observed in survival, mostly explained by the development of distant metastasis in patients with locally advanced disease (IKOMA et al., 2017; MAURER et al., 2011).

CRC classification based on right- or left-sided location has been shown to have a prognostic value. Primary tumour sidedness has also been used as a predictive marker for response to anti-*EGFR* therapy (GHIDINI; PETRELLI; TOMASELLO, 2018). However, a recent report showed that the primary tumour sidedness may not fully recapitulate molecular variations in tumour biology. Important variations of the molecular profiles were observed along the colon to the rectum, with unique features being observed in the sigmoid colon to the rectum as well as in the transverse colon (LOREE et al., 2018). These data reinforce the current knowledge that colon and rectal cancer are different entities, which is particularly important for precision medicine which is guided by molecular aberrations rather than histology alone (GLYNNE-JONES et al., 2017).

Current RC staging based on histopathology and imaging has a limited ability to predict prognosis, thus leading to attempts to elaborate molecular classifications. Unfortunately, until now there is no molecular marker for rectal cancer which can help in medical decision (GLYNNE-JONES et al.,

2017). In addition, there are few options of treatment for patients with advanced disease (GHIDINI; PETRELLI; TOMASELLO, 2018).

Immunotherapy has revolutionized cancer treatment over the last few years by allowing improvements in overall survival. Therefore, the correct selection of candidates is essential (RILEY et al., 2018). Unfortunately, most CRC cases, including the large majority of RC, do not respond to treatment with immune checkpoint blockers (MERLANO et al., 2017).

Several factors can influence the likelihood of response to immunotherapies, which include the composition of the tumour-infiltrating immune cells. Thus, the interactions between a tumour and immune cells have been exploited. The possibility of combining immune and non-immune therapies leading to tumour microenvironment modulation and strengthen the immune response against the tumour cells is now coming into focus.

Transcriptomic analysis has provided the opportunity to identify four consensus molecular subtypes (CMS) in CRC, which can be associated with distinct prognosis (GUINNEY et al., 2016). The abundance of tumour infiltrating immune cells can be estimated using computational tools (HACKL et al., 2016). Becht et al. (2016) reported the integration of the composition of the tumour microenvironment with the CMS classification in CRC, showing an association between the molecular subtypes and distinct immune composition (BECHT et al., 2016a).

Thus, this study was designed to identify molecular signatures and immunological profiles associated with metastatic progression in rectal adenocarcinoma. The two profiles will be integrated in order to create a biological aggressiveness classification for rectal cancer.

PATIENTS AND METHODS

Patients and Tissue samples collection

Fifteen fresh-frozen rectal adenocarcinomas (RC) samples were obtained from patients who underwent to biopsy or surgery prior to any

chemoradiation treatment at Barretos Cancer Hospital and Botucatu Clinical Hospital. The patients were advised of the procedures and provided written informed consent. The Human Research Ethics Committee of both institutions approved the study. The diagnostic criteria and tumour classification were based on World Health Organization (WHO) and American Joint Committee on Cancer (AJCC) recommendations, respectively (AMIN et al., 2017; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2000). Clinical and histopathological data are summarized in Table 1. Two histopathologically confirmed normal rectal tissues were obtained from autopsies and were considered as controls (N)

Analysis design

The expression profiles from RC samples obtained from 15 patients were used to identify the molecular signatures that were correlated with the pathological stage, the currently used prognostic marker. To identify a signature associated with metastasis, we selected two groups of patients: metastatic (M, N=10), composed by the patients with metastasis at diagnosis (M1, N=4) or which developed metastasis during follow-up (N=6); and non-metastatic (NM, N=5), which includes patients with good outcome who remained free of disease for at least 36 months after surgery (average 53 months, range 41 to 66) (Table 1).

Nucleic acid extraction

Tumour and normal tissues were macrodissected to guarantee at least 80% of a tumour or normal epithelial cells, respectively. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. RNA concentration was measured with NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), The RNA integrity was evaluated in the Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 LabChip kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Transcriptome analysis

Global gene expression analysis was performed using human Clariom D platform (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), that allows the user to interrogate more than 540,000 transcripts.

cRNA preparation, samples hybridization and scanning were performed following the Affymetrix provided protocols, (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Briefly, the Affymetrix GeneChip WT Kit was used for cDNA preparation and biotin labelling. cRNA was purified using an Affymetrix magnetic bead protocol

The Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash, and Stain kit was used for array processing. Arrays were incubated for 16 h in Affymetrix GeneChip 645 hybridization oven at 45°C with rotation at 60 rpm. The chips were subsequently scanned with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Raw data were processed using Transcriptome Analysis Console (TAC) software, version 4.0.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and normalized with SST-RMA method. All recommended controls were checked.

Differentially expressed genes were obtained with limma package (Linear Models for Microarray Data version 3.9.19) available from Bioconductor (https://www.bioconductor.org) using R software (RITCHIE et al., 2015). Filtering characteristics of fold-change (FC), <-2.0 and > 2.0, and p-value adjusted by FDR (False Discovery Rate) <0.05 were used to identify the differentially expressed genes, subsequently used in gene and pathway enrichment and network analyses. The identification of biological pathways was performed with the enrichment of the differentially expressed genes selected in the study. The enrichr package (KULESHOV et al., 2016) was used considering the KEGG and REACTOME databases, as well as a p <0.05.

Kaplan-Meier plot and log-rank test for the cancer-specific survival (CSS) according to *ANLN* expression levels was performed. *ANLN* expression was dichotomized as overexpressed or normal if *ANLN* levels in each sample were above or below the median in all tumour samples, respectively. Statistical

analyses were performed by using SPSS software version 19.0 (SPSS, Chicago, Ill).

Cross-study validation with TCGA data

Gene expression profile of rectal tumour (READ) samples was obtained from TCGA level 3 RNASeqV2 using the UCSC Xena database (http://xena.ucsc.edu). From 105 READ samples, only 40 cases were included in the analysis (Table 1). Exclusion criteria were cases with different histology other than adenocarcinoma; non-primary tumours; tumours from another anatomical site; cases with synchronic tumours or without RNA-seq data. Four adjacent normal tissues (NT) were used as controls.

Estimation of the abundance of immune cell populations

The relative abundance of immune populations in tumours and normal tissues were estimated from each case. xCell (http://xCell.ucsf.edu/), a platform that relies on ssGSEA to infer populations of 64 types of immune and stromal cells.

RESULTS

Transcriptome profile of RC

Unsupervised hierarchical clustering analysis correctly classified normal and tumour samples (Figure 1A). However, only 6/10 metastatic (M) tumours clustered together, indicating a heterogeneous transcriptome profile. No association between the transcriptome profile and the clinical and pathological features was observed (Figure 1A).

By comparing RC samples and N tissues, 1992 differentially expressed transcripts were detected (FC>2 and <-2, $p<0.05$, FDR<0.01), including coding and non-coding genes, pseudogenes and small RNAs (data not shown). Enrichment analysis indicated muscle contraction, cardiac

conduction, ABC transporters, axon guidance and tight junction pathways, among others, are the main significant deregulated pathways in RC (adjusted $p<0.05$, Suplemmentary Table 2).

The comparison between M and NM group revealed 133 differentially expressed transcripts ($p<0.05$, FC>2.0 and <-2; Supplementary Table 1). The top deregulated coding genes ($p\leq0.01$) are shown in Table 2, being 14 upregulated and 13 down-regulated. Among the down-regulated genes, *SEMA6A* (semaphorin 6A) showed the lowest fold change (FC=-8.18, $p=0.002$, Table 2).

Conversely, *ANLN* (anillin actin-binding protein) gene showed the highest FC (FC=5.27, $p=0.001$). The average difference in expression for *ANLN* transcript was 18.31-fold in NM samples and 96.42-fold in M when compared to N tissues (data not shown). Additionally, to investigate if *ANLN* was associated with prognosis, cancer-specific survival analysis was performed. This analysis showed that *ANLN* overexpression was associated with shorter survival in RC patients ($p=0.007$, Figure 1B).

Enrichment Analyses

With the aim of revealing potential biomarkers and therapeutic targets for metastatic RC, a gene set enrichment analysis was performed, revealing 7 deregulated pathways (Table 3). Of note, deregulation in *VEGF* pathway was detected in M group, with two out of 8 genes involved: *VEGFC* (FC = 2.066, $p = 0.040$) and *VEGFA* (FC = -4.208, $p = 0.024$).

Cross-study validation with TCGA dataset

In order to confirm potential prognostic biomarkers in RC, a cross-study validation using TCGA data was performed. First, both NM and M groups were compared to N samples, and then only those commonly deregulated genes detected in these analyses (Pp<0.05, FC>2 and <-2, FDR<0.05) were further compared to external data (TCGA) considering the same statistical criteria. The intersection between the two lists of differentially expressed genes in M *versus* NM samples, and also deregulated in the same direction

(negatively or positively deregulated), resulted in 13 genes (Table 4). Notably, *ANLN* was confirmed as differentially expressed in cross-study validation, thus providing additional evidence of the *ANLN* gene as a potential biomarker in RC the difference in fold-change between the groups may be attributed to the possible lack of homogeneity in the M0 TCGA samples regarding the development of metastasis after diagnosis. Other genes related to important carcinogenesis functions, such as *XRCC2, KIF14*, and *GPX3* were also detected

Infiltrating Immune Cell Populations Analysis

Although xCell algorithm can detect 64 cells, we focused on 30 directly related to the immune system as well as with stroma which are relevant for carcinogenesis (Figure 2). Differences were observed for some cell populations for both innate and adaptive cell populations in metastatic tumours (M) compared to non-metastatic tumours (NM).

For innate immunity cells, M tumours showed higher scores of plasmacytoid dendritic cells (pDC) than NM tumours (p=0.0357).

For adaptative immune cells, Th2 cells were more prevalent in M samples than in NM (p=0.040). Higher scores of Treg cells was observed in the NM group when compared to the M group, although it was marginally significant (p=0.059). The ImmuneScore, which comprehends the scores of all immune cells showed no difference between the groups (Figure 2).

Analysis of the stroma cells showed no statistical difference between metastatic and non-metastatic tumours (Figure 2).

DISCUSSION

Despite the carcinogenesis of CRC has been elucidated, the metastatic process remains unclear. (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). Accordingly, tumour microenvironment, which includes immune infiltrating cells, has been implicated in tumour progression and

metastasis. In CRC, high levels of tumour-infiltrating (CD3+) T cells and cytotoxic (CD8+) T have been associated with better prognosis (GALON et al., 2006). Here, we investigated molecular and immunological profiles associated with metastatic progression in rectal adenocarcinomas.

Despite 1992 differentially expressed transcripts detected in RC compared to N samples, the difference between metastatic *versus* non-metastatic was more modest, showing only 133 transcripts. Among these, *ANLN* gene showed the highest fold change in M tumours. *ANLN* gene encodes an actin-binding protein, fundamental for cytokinesis during cell division. The protein is transported from the nucleolus to the periphery of the cell, where, during the anaphase, it contributes to the contractile ring together with GTPase RhoA, actin, myosin II and septin (PIEKNY; MADDOX, 2010). Zhou et al. (2015) demonstrated that *ANLN* knockdown is able to inhibit cell proliferation and colony formation in breast cancer cell lines due to cell cycle disruption in G2/M and decreased expression of cyclins (ZHOU et al., 2015).

High transcript levels of *ANLN* mRNA was reported in a range of human tumours, including breast, ovarian, kidney, liver, lung, endometrial, pancreatic and bladder tumours. In addition, higher levels of *ANLN* was reported to be positively correlated with worse prognosis (HALL et al., 2005; ZENG et al., 2017). In our samples, progressive levels of *ANLN* were detected from normal to tumours, with the highest levels detected in M group; thus suggesting *ANLN* as a putative prognostic marker in RC. In addition, *ANLN* overexpression was associated with worse outcome. Patients whose tumours presented higher levels of *ANLN* showed shorter survival. A previous study reported the elevated expression of *ANLN* in CRC samples. Survival analysis including 228 CRC (115 colon cancer and 113 RC) also showed an association between high *ANLN* protein expression and poor survival. Additionally, *ANLN* was detected as an independent risk factor for metastasis (WANG et al., 2016a). Moreover, validation analysis using TCGA dataset confirmed *ANLN* as a potential biomarker in rectal adenocarcinoma. Further studies are needed to verify the prognostic value of *ANLN* in rectal cancer.

VEGF pathway was detected as deregulated in metastatic RC samples. Vascular endothelial growth factors (VEGF) act on the tumour cell

increasing cell survival and modulate the sensitivity to chemotherapy. In CRC cells the *VEGF* is able to act through intracrine mechanisms; knockout of genes responsible for VEGF coding on CCR cells lines led to decreased cell proliferation, increased apoptosis and increased sensitivity to chemotherapy (BHATTACHARYA et al., 2016). Due to these properties, anti-VEGF therapy with anti-angiogenic agents such as bevacizumab and sunitinib has been used. Inhibition of VEGF interaction with their receptors VEGFR leads to activation of phosphatases followed by reduction of PRTK and inhibition of cell migration. These agents accompanied by chemotherapy are the standard treatment for patients with inoperable metastatic colorectal cancer, but the overall survival gained with this therapy is small and inevitably the disease returns to progress (CARMELIET; JAIN, 2011). This low efficiency may be due to intracrine signalling since the superficial inhibition of the VEGF-VEGFR interaction does not affect this signalling pathway (BHATTACHARYA et al., 2017).

Another possibility is the changes in the extracellular matrix in response to hypoxia created by anti-VEGF therapy, such as increased deposition of hyaluronic acid and glycosaminoglycans which increases the rigidity of the tumour tissue, making the infusion of therapeutic drugs harder (RAHBARI et al., 2016). One way to bypass the mechanisms of resistance to anti-VEGF therapy is by silencing of its coding genes, like *VEGFC*, using siRNAs. This technique proved to be quite promising in CRC cell cultures, as it was not only able to affect all pathways of signalling of *VEGF* including the intracrine pathways, as it did not generate modifications in the extracellular matrix that are observed in the therapy with conventional drugs (BHATTACHARYA et al., 2017).

Tabernero et. al. (2013) conducted a phase 1 clinical trial to observe the pharmacokinetics, mechanisms of action, and clinical safety of administration of anti-*VEGF* interference RNA to cancer patients. This study involved patients with various metastatic tumours including colorectal cancer. The results were positive, with a reduction in tumour size in most patients and a complete therapeutic response in one patient, reinforcing the potential of gene silencing in the treatment of cancer (TABERNERO et al., 2013).

Our cross-validation study also revealed genes with important carcinogenesis functions, among them *XRCC2* and *KIF14*, both upregulated, and *GPX3* downregulated in metastatic rectal cancer.

Neoadjuvant therapy is the standard treatment protocol for patients with locally advanced rectal cancer, but not all patients show a response to the treatment (HOFMEISTER et al., 2016). The X-ray repair cross-complementing protein 2 encoded by the *XRCC2* gene contributes to the repair of double-stranded DNA breaks in response to ionizing radiation damage, such as those found in tumour cells of patients undergoing radiation therapy. *XRCC2* overexpression increases resistance to radiotherapy, leading to more invasive behaviour in glioblastoma multiform, cervical cancer, lung cancer and rectal cancer (XU et al., 2014b). Knockdown of *XRCC2* prompted increased sensitivity to radiotherapy in colorectal cancer cells along with disruption of the cell cycle in G2/M through inhibition of repair of DNA damage (WANG et al., 2014). Negative expression of *XRCC2* has already been associated with a greater of tumour regression grade in patients undergoing neoadjuvant therapy and may appear to be a predictor of response to treatment (QIN et al., 2015).

KIF14 (kinesins family member 14) gene encodes a protein that binds to chromatin and microtubules during mitotic spindle formation. *KIF14* can be classified as an oncogene and has been observed as overexpressed in liver, lung, breast, glioma, laryngeal, ovarian, and prostate cancers (XU et al., 2014). Several other members of the kinesin family have been reported as overexpressed in tumours including *KIF3A, KIF3B, KIF11* and *KIF20A* (WANG et al., 2016b). *KIF14* silencing induces cytokinesis failure, resulting in cell cycle disruption in G2, multinucleated cells, aneuploidies and apoptosis. Another effect of *KIF14* suppression is transcriptional alterations that activate the signalling pathways of p53 and TGF-β, along with the expression of cell cycle regulatory proteins such as p21, *CCNB1*, among others (CARLETON et al., 2006; ZHANG et al., 2017).

The expression levels of this gene could be used to predict prognosis since they have been positively correlated with the Gleason score in prostate cancer patients indicating shorter overall survival (ZHANG et al., 2017). Wang et al. (2018) recently showed upregulation of *KIF14* gene in 36 CRC tissues

compared with adjacent non-neoplastic tissues and also confirmed using two external datasets. In vitro and in vivo assays showed that *KIF14* can promote CRC cell proliferation and boosted the cell cycle by activation of protein kinase B, demonstrating the oncogenic role of *KIF14* in colorectal tumorigenesis (WANG et al., 2018). Thus, KIF14 might be a promise prognostic biomarker in rectal cancer, although further analysis should be performed to confirm its prognostic value.

The *GPX3* (glutathione peroxidase 3) gene encodes an antioxidant enzyme, a key component of cellular antioxidant regulation, that acts on the neutralization of reactive oxygen species (ROS). ROS are continuously generated by endogenous and exogenous pathways, causing DNA damage that can decrease genome integrity (BRIGELIUS-FLOHÉ; KIPP, 2009). Decreased expression of *GPX3* gene mediated by its promoter hypermethylation has been described in several human tumours, such as oesophageal tumours, prostate, stomach and leukaemia, indicating that G*PX3* acts as a tumour suppressor (ZHANG et al., 2014). Furthermore, decreased expression of *GPX3* has already been linked to increased resistance to platinum-based chemotherapy due to changes in redox balance within cells and is capable of promoting initiation, development, and metastasis (CHEN et al., 2011; ZHOU et al., 2017). Accordingly, a recent report showed an association between *GPX3* hypermethylation and gene reduced expression in a subset of CRC samples. In vitro and in vivo models confirmed the importance of *GPX3* for CRC cells resistance to oxaliplatin and cisplatin. Moreover, *GPX3* methylation status was indicated as a predictive biomarker for platinum sensitivity in CRC (PELOSOF et al., 2017).

In light of the recent advances in cancer immunotherapies that resulted in durable clinical responses in patients with various malignancies; the interaction between tumours and the immune system has arisen as a critical aspect of the tumour biology. We applied xCell algorithm to determine the immune infiltrating cells in metastatic (M) and non-metastatic (NM) rectal tumours.

Enrichment of infiltrating plasmacytoid dendritic cells (pDC) was observed in M tumours. Plasmacytoid DC is a subpopulation of dendritic cells

specialized in the secretion of Type I interferon (IFN-α), and other cytokines like IL-6, IL-8 (*CXCL8*) and TNF-α. There is evidence that in the tumour microenvironment these cells play a role in the development of immunosuppression (DEMOULIN et al., 2013). Increased infiltration of pDC has already been linked to the poor prognosis of melanoma, head and neck cancers, ovarian cancer, and breast cancer, although their role in the anti-tumour immune response is still unknown.

Studies have shown that pDCs recruited to the tumour site are in an inactive state and present inadequate activity with reduced secretion of IFN-α and inability to activate T cells, which leads to the creation of an immune tolerance accompanied by the increase of regulatory T cells (DEMOULIN et al., 2013; Revised in MITCHELL; CHINTALA; DEY, 2018). The loss of pDC function can be explained by the down-regulation of Toll-like Receptors (TLRs) on their surface; in the presence of prostaglandin 2 (PGE 2) and tumour growth factor β (TGF-β) suppressors, receptor ligands TLR7 and TLR9 become incapable of inducing the secretion of IFN-α and TNF-α (BEKEREDJIAN-DING et al., 2009).

There are some therapeutic protocols that seek to stimulate pDCs to secrete IFN-α. Imiquimod is an agonist of TLR7 which promotes stimulation of pDCs with NF-κB activation. Among the tumours that showed a positive response to this treatment, we can mention basal cell carcinomas and melanomas (SCHÖN; SCHÖN, 2008). There is no data regarding the efficacy of pDC stimulatory drugs in colorectal tumours. However, in view of the efficacy of melanoma treatment, a highly aggressive and treatment-resistant tumour type, the possibilities seem promising.

In addition to these already mentioned functions, pDCs can act as antigen-presenting cells, promoting T cell differentiation in T-Regulator (T-reg) or Th2 cells (ASPORD et al., 2013). Interestingly, in our study, Th2 was detected with higher scores in metastatic RC. In contrast, lower scores of Treg cells were observed in M group. The lower Treg cells can be explained by the conversion of these cells into Th9 mediated by IL-4, produced by Th2 cells. Th9 cells is a subpopulation that strongly acts in antitumor response, but there is no consensus regarding the role of Th2 cells in cancer. Some studies show that these cells are associated with favourable prognosis in lymphomas, gastric and

breast cancer, and leukaemia. In contrast, other studies associate Th2 cells with poor prognosis in gynaecological, pancreatic, digestive and gastric cancers (Reviwed in CHRAA et al., 2018). Th2 cells are one of the largest cell subpopulations found in the tumour microenvironment and play an ambivalent role in tumour response. The cytokines secreted by Th2 cells (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13) have been implicated in mechanisms of a tumour immune evasion as well as in anti-tumour response. For instance, IL-4 can mediate the conversion of Treg cells into Th9, a cellular subpopulation that strongly acts on the antitumor response (LIU et al., 2015).

IL-4 and IL-13 can mediate the attraction of neutrophils and macrophages to tumour microenvironment, acting in tumour clearance. IL-10 promotes suppress anti-tumour response by inhibiting antigen processing and presentation by dendritic cells (BURKHOLDER et al., 2014; CHRAA et al., 2018).

Regulatory T cells are characterized by the expression of the CD4 + and CD25 + receptors on their surface and by the expression of the nuclear transcription factor FOXP3. This cell subpopulation is able to inhibit the activity of other T cell populations through the production of IL-10 and TGF-β, causing IL-12 depletion and suppression of maturation and function of dendritic cells (FINOTELLO; TRAJANOSKI, 2017) However, just like Th2 cells, the role of Tregs in carcinogenesis has not yet been fully understood. In colorectal cancer, they have already been implicated as factors for both good prognosis and poor prognosis(CHRAA et al., 2018) It has already been shown that there are subpopulations of Treg cells with different inhibitory potencies two subpopulations already described are the Treg $FOXP3^{lo}$ and Treg $FOXP3^{hi}$, the development of these cellular subtypes is influenced by the microenvironment (SAITO et al., 2016). The Treg $FOXP3^{lo}$ cells show low immune suppressor activity and have been reported correlated with better prognostic in colorectal tumours, the expansion of this population is related to the secretion of IL-12 and TGF-β by the tissues and the infiltration of the intestinal bacterium *Fusobacterium nucleatum.* The local increase of Treg $FOXP3^{lo}$ could be advantageous to suppress the development of tumours (SAITO et al., 2016)

In conclusion, in this study, the transcriptome analysis of metastatic and non-metastatic rectal adenocarcinomas revealed potential biomarkers associated with disease progression. Of note, *ANLN* gene identified here as a prognostic marker associated with cancer specific-survival was also identified in a cross-study validation study using TCGA dataset. Furthermore, the immunological profile evaluated here revealed a putative immune evasion mechanism associated with metastatic development in RC. Further studies with a larger cohort of patients are warranted to confirm the clinical relevance of these findings.

Table 1. Demographic and histopathological data of patients with rectal cancer (RC).

Variables	**RC** **N=15 (%)**	**READ** TCGA **N=40 (%)**
Age (years)		
Average (SD)	62 (11.5)	65
Follow-up (months)		
Median (min-max)	49 (7-66)	26 (0.5-131)
Gender		
Male	7 (46.7)	17 (42.5)
Female	8 (53.3)	23 (57.5)
Tumour size (T)		
T1	1 (6.7)	2 (5.0)
T2	1 (6.7)	4(10.0)
T3	8 (53.3)	29 (72.5)
T4	5 (33.3)	4 (12.5)
NA	-	1 (2.5)
Nodal status		
Positive (N1)	7 (46.7)	21 (52.5)
Negative (N0)	8 (53.3)	18 (45.0)
Undetermined (Nx)	-	1 (2.5)
Distant metastasis		
Positive (M1)	4 (26.7)	6 (15.0)
Negative (M0)	11 (73.3)	30 (75,0)
Undetermined (Mx)	-	4 (10.0)
Stage		
I	3 (20)	4 (10)
II	4 (26.7)	14 (35)
III	4 (26.7)	15 (37.5)
IV	4 (26.7)	6 (15)
NA	-	1 (2.5)
Metastasis (follow-up)	6 (40)	NA
Deceased by disease	6 (40)	8 (20)

SD- standard deviation; NA – not available.

Table 2. Differentially expressed coding genes detected in metastatic (M) compared to non-metastatic (NM) rectal carcinomas.

Genes	Description	Fold change	p-value
Upregulated			
ANLN	anillin actin binding protein	5.265	0.0014
OSBPL9	oxysterol binding protein-like 9	4.275	0.0181
TMEM154	transmembrane protein 154	3.647	0.0060
STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	3.306	0.0063
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	3.226	0.0183
UBA5	ubiquitin-like modifier activating enzyme 5	2.705	0.0079
RPL10P5	ribosomal protein L10 pseudogene 5	2.437	0.0067
NCOR1P3	nuclear receptor corepressor 1 pseudogene 3	2.369	0.0049
AC104843.4; RPS20P19	ribosomal protein S20 (RPS20) pseudogene	2.354	0.0069
RP1-99E18.2; ARL4AP5	ADP ribosylation factor like GTPase 4A pseudogene 5	2.284	0.0068
LTV1	LTV1 ribosome biogenesis factor	2.159	0.0195
CASP8AP2	caspase 8 associated protein 2	2.127	0.0113
TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	2.080	0.0079
RPL39P6	ribosomal protein L39 pseudogene 6	2.054	0.0089
Downregulated			

SEMA6A	sema domain transmembrane domain (TM). and cytoplasmic domain (semaphorin) 6A	-8.181	0.0017
MUC17	mucin 17 cell surface associated	-3.775	0.0147
MIR548T	microRNA 548t	-3.092	0.0029
SLC17A4	solute carrier family 17. member 4	-2.840	0.0127
OR2A9P; OR2A20P	olfactory receptor family 2 subfamily A member 9 pseudogene; olfactory receptor family 2 subfamily A member 20 pseudogene	-2.825	0.0043
PER3	period circadian clock 3	-2.788	0.0125
NAAA	N-acylethanolamine acid amidase	-2.693	0.0131
SLC6A20	solute carrier family 6 (proline IMINO transporter). member 20	-2.417	0.0030
HRCT1	histidine rich carboxyl terminus 1	-2.339	0.0026
IQCB2P	IQ motif containing B2 pseudogene	-2.167	0.0119
AC074019.1; mokerbo	SNF8. ESCRT-II complex subunit. homolog (S. cerevisiae) (SNF8) pseudogene	-2.065	0.0188
GSTA9P	glutathione S-transferase alpha 9. pseudogene	-2.058	0.0078
MAML3	mastermind-like transcriptional coactivator 3	-2.006	0.0153

Table 3. Enrichment analysis of the differential genes detected between metastatic (M) versus non-metastatic (NM) rectal carcinomas

Term	Overlap	*P*-value	Adjusted *P*-value	Genes
VEGF binds to VEGFR leading to receptor dimerization - Homo sapiens - R-HSA-195399	2/8	0.0043	6.49E-01	*VEGFC; VEGFA*
VEGF ligand-receptor interactions_Homo sapiens_R-HSA-194313	2/8	0.0043	6.49E-01	*VEGFC; VEGFA*
EPHA-mediated growth cone collapse_Homo sapiens_R-HSA-3928663	2/34	0.0701	1.00E+00	*LYN; VEGFA*
Choline catabolism_Homo sapiens_R-HSA-6798163	1/6	0.0744	1.00E+00	*CHDH*
Insulin secretion_Homo sapiens_hsa04911	3/85	0.0956	9.78E-01	*SLC2A1; CACNA1D; CREB5*
WNT mediated activation of DVL_Homo sapiens_R-HSA-201688	1/8	0.0979	1.00E+00	*PIP5K1B*
Vitamin C (ascorbate) metabolism_Homo sapiens_R-HSA-196836	1/8	0.0979	1.00E+00	*SLC2A1*
Nicotinamide salvaging_Homo sapiens_R-HSA-	1/8	0.0979	1.00E+00	*NAPRT*

Table 4. Differentially expressed genes in Metastatic (M) versus Non-Metastatic (NM) rectal cancers and also versus normal (N) samples identified in our cohort and in cross-study validation (TGCA)

	FC	**FC**
Gene symbol	**RC**	**TCGA**
ANLN	5.26	1.25
BEST4	1.34	1.45
XRCC2	1.34	1.31
POLQ	1.26	1.38
CENPF	1.26	1.29
KIF14	1.17	1.29
STK32A	1.03	1.09
CNR1	1.02	1.31
GPX3	-1.01	-1.39
BMP3	-1.01	-1.61
GLIPR2	-1.09	-1.13
NEGR1	-1.22	-1.28
MYC	-1.36	-1.07

FC: log FC ((M *vs* N) / (NM *vs* N))

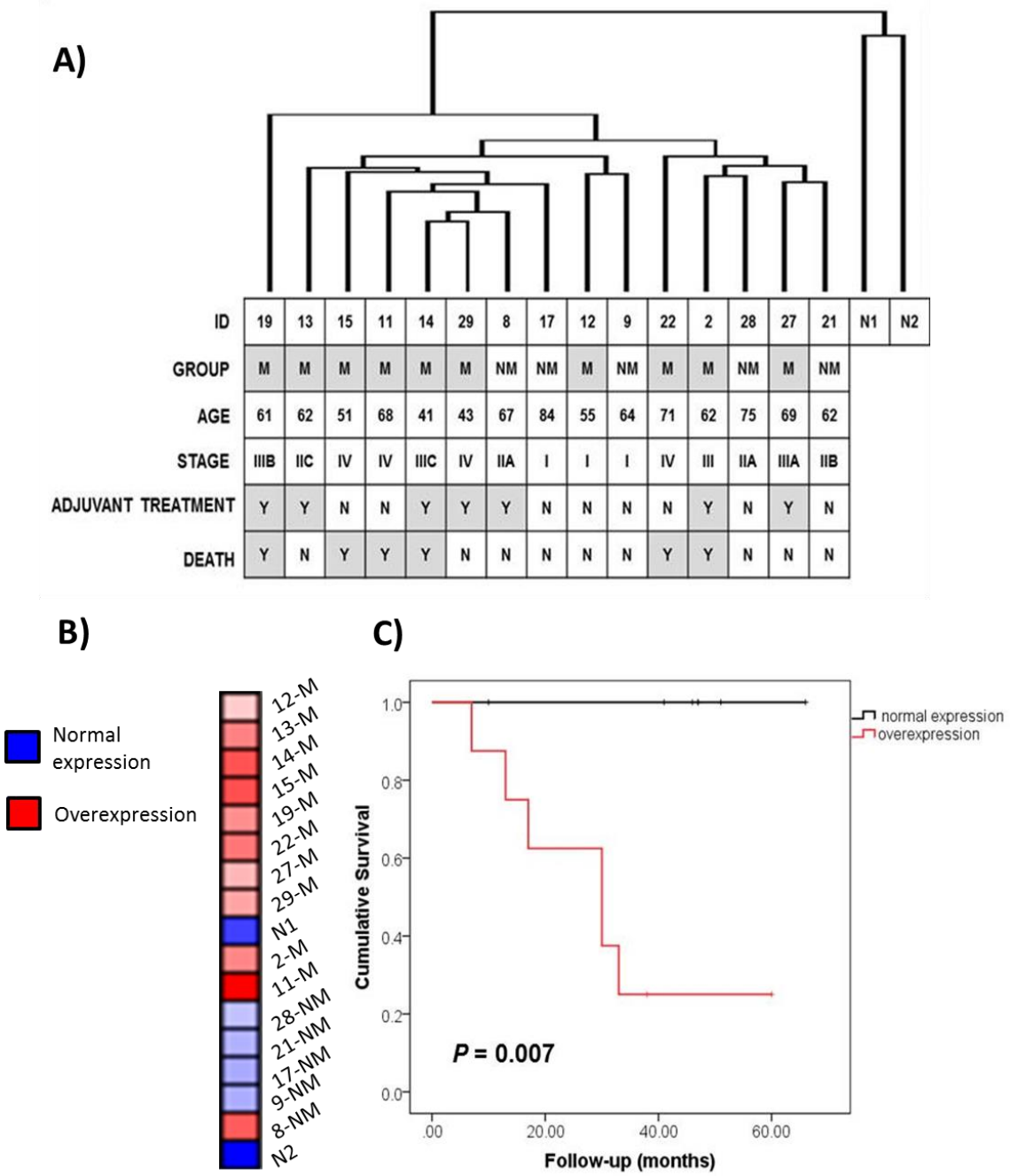

Figure 1. **A)** Hierarchical clustering analysis. Dendrogram resulted from unsupervised analysis including rectal tumours and normal tissues (N). Metastatic (M) and non-metastatic (NM) groups, as well as age (years), pathological stage, adjuvant treatment and death status for each patient, are shown.Y- Yes; N- no. **B)** Samples' classification according ANLN expression **C)** Cancer-specific survival analysis according to ANLN transcript levels in patients with rectal carcinoma (RC). Log-rank test.

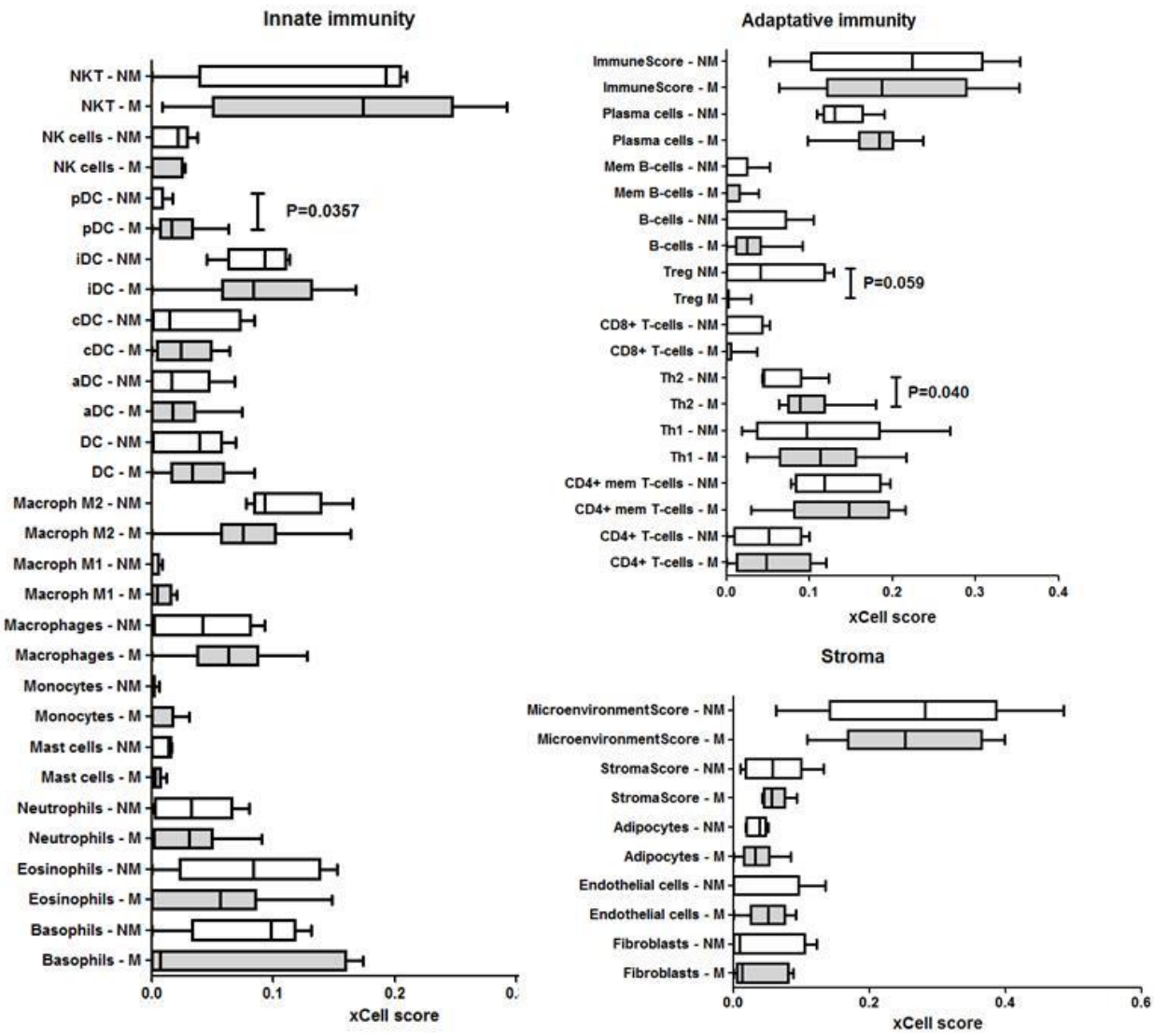

Figure 2. Distribution of cell populations in metastatic (M) and non-metastatic (NM) rectal tumours identified by the cell algorithm. Mann-Whitney test.

References

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.; GASPAR, 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.

ASPORD, 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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26994146>. Acesso em: 4 jan. 2019.

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.

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.bjcancer.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.

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.

CARMELIET, 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.

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.

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.

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.

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.

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; LAGORCE-PAGÈS, C.; TOSOLINI, M.; CAMUS, M.; BERGER, A.; WIND, P.; ZINZINDOHOUÉ, 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.

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.

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: <%5C%5Cgbkenpfsphg0001%5CResolute%5CDATA%5CPurpleHat%5Cclients.ph%5CMerckSerono%5CAdmin%5CReferences%5CCRC%5CGuinney et al. Nature Medicine 2015_CMS.pdf>

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 I, 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.

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.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive SystemInternational 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.

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.

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.

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.

MAURER, C. A.; RENZULLI, P.; KULL, C.; KÄSER, S. A.; MAZZUCCHELLI, 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.

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.

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.

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.; MADDOX, 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.

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.

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.

RILEY, J. M.; CROSS, A. W.; PAULOS, C. M.; RUBINSTEIN, M. P.; WRANGLE, J.; CAMP, E. R. 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.

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>

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.

TABERNERO, 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.; CEHELSKY, 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.

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.

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, 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.

Suplemmentary Table 1. Differentially expressed transcripts detected by comparing Metastatic (M) versus Non-Metastatic (NM) rectal carcinomas.

Gene Symbol	Description	Group	FC (M *vs* NM)	*P*-value
LOC105747689	uncharacterized LOC105747689	NonCoding	-2.348	0.001
ANLN	anillin actin binding protein	Multiple_Complex	5.265	0.001
SEMA6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	Multiple_Complex	-8.181	0.002
SLC25A5P3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5 pseudogene 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:507]	Pseudogene	2.554	0.002
HRCT1	histidine rich carboxyl terminus 1	Coding	-2.339	0.003
MIR548T	microRNA 548t	Multiple_Complex	-3.092	0.003
SLC6A20	solute carrier family 6 (proline IMINO transporter), member 20	Multiple_Complex	-2.417	0.003
CTD-2335O3.3	novel transcript	NonCoding	-2.516	0.003
MIR6833	microRNA 6833	Precursor_microRNA	2.370	0.004
RP11-801F7.1	novel transcript	NonCoding	-2.553	0.004
OR2A9P; OR2A20P	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 9 pseudogene; olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 20 pseudogene	Multiple_Complex	-2.825	0.004

NCOR1P3	nuclear receptor corepressor 1 pseudogene 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:42996]	Multiple_Complex	2.369	0.005
MIR4273	microRNA 4273	Precursor_microRNA	-2.269	0.005
RP11-174O3.3	putative novel transcript	NonCoding	-2.101	0.005
KF511026.1		Precursor_microRNA	2.340	0.005
LINC01091	long intergenic non-protein coding RNA 1091	NonCoding	-3.467	0.005
TMEM154	transmembrane protein 154	Multiple_Complex	3.647	0.006
STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Multiple_Complex	3.306	0.006
RPL10P5	ribosomal protein L10 pseudogene 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:35724]	Multiple_Complex	2.437	0.007
RP1-99E18.2		Multiple_Complex	2.284	0.007
AC104843.4		Multiple_Complex	2.354	0.007
GSTA9P	glutathione S-transferase alpha 9, pseudogene [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49902]	Multiple_Complex	-2.058	0.008
UBA5	ubiquitin-like modifier activating enzyme 5	Multiple_Complex	2.705	0.008
TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	Multiple_Complex	2.080	0.008
RPL7P14	ribosomal protein L7 pseudogene 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:35984]	Pseudogene	-2.249	0.008
RPL39P6	ribosomal protein L39 pseudogene 6 [Source:HGNC	Multiple_Complex	2.054	0.009

	Symbol;Acc:HGNC:35803]			
RP11-322F10.2		NonCoding	2.028	0.010
IGFBP7-AS1	IGFBP7 antisense RNA 1	NonCoding	-2.034	0.010
RPS20P14	ribosomal protein S20 pseudogene 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36692]	Pseudogene	2.148	0.010
RPL17P33	ribosomal protein L17 pseudogene 33	Pseudogene	2.209	0.010
bloswoybu; RP11-379B18.6	Transcript Identified by AceView; novel transcript	NonCoding	-2.272	0.011
CASP8AP2	caspase 8 associated protein 2	Multiple_Complex	2.127	0.011
IQCB2P	IQ motif containing B2 pseudogene [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17727]	Multiple_Complex	-2.167	0.012
FAM85A; AC145124.2	family with sequence similarity 85, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17606]; novel transcript	NonCoding	-3.178	0.012
RP11-571I18.4	novel transcript	NonCoding	-2.583	0.012
RNU6-704P	RNA, U6 small nuclear 704, pseudogene [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:47667]	Small_RNA	-2.019	0.012
PER3	period circadian clock 3	Multiple_Complex	-2.788	0.012
SLC17A4	solute carrier family 17, member 4	Coding	-2.840	0.013
NAAA	N-acylethanolamine acid amidase	Multiple_Complex	-2.693	0.013

AL354936.1		Precursor_microRNA	-2.127	0.013
AC009413.2		Pseudogene	2.252	0.014
LINC01612	long intergenic non-protein coding RNA 1612	NonCoding	6.500	0.014
MUC17	mucin 17, cell surface associated	Multiple_Complex	-3.775	0.015
YWHAEP5	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon pseudogene 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49439]	Pseudogene	2.060	0.015
MAML3	mastermind-like transcriptional coactivator 3	Multiple_Complex	-2.006	0.015
CH17-140K24.2	novel transcript, antisense to PCDHB5, PCDHB6, PCDHB7, PCDHB8, PCDHB9, PCDHB10, PCDHB11, PCDHB12, PCDHB13, PCDHB14 and PCDHB16	NonCoding	-2.006	0.017
RP11-137J7.3		Multiple_Complex	2.065	0.018
RNU6-108P	RNA, U6 small nuclear 108, pseudogene [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:47071]	Small_RNA	2.756	0.018
OSBPL9	oxysterol binding protein-like 9	Multiple_Complex	4.275	0.018
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	Multiple_Complex	3.226	0.018
AC074019.1; mokerbo	Transcript Identified by AceView; putative novel transcript	Multiple_Complex	-2.065	0.019
EVADR; RP11-462G2.1	uncharacterized LOC101928353; novel transcript	NonCoding	15.632	0.019
LTV1	LTV1 ribosome biogenesis factor	Multiple_Complex	2.159	0.020
GTF2H5	general transcription factor IIH subunit 5	Coding	2.183	0.020

CACNA1D	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	Multiple_Complex	-2.889	0.021
RPS12	ribosomal protein S12	Multiple_Complex	2.133	0.021
TMEM237	transmembrane protein 237	Multiple_Complex	2.334	0.021
AC084262.3		Precursor_microRNA	-2.302	0.021
AC016745.3	novel transcript	NonCoding	-2.161	0.021
MIR6739	microRNA 6739	Precursor_microRNA	-2.203	0.022
MGAM2	maltase-glucoamylase 2 (putative)	Multiple_Complex	-4.009	0.023
LYPLA1	lysophospholipase I	Multiple_Complex	2.066	0.023
MIR4774	microRNA 4774	Precursor_microRNA	-2.107	0.023
RPS20P10	ribosomal protein S20 pseudogene 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36800]	Multiple_Complex	2.888	0.023
RP11-1102P16.1	novel transcript	NonCoding	-2.060	0.023
SFXN1	sideroflexin 1	Multiple_Complex	2.314	0.024
LYN	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	Multiple_Complex	2.882	0.024
PAG1	phosphoprotein membrane anchor with glycosphingolipid microdomains 1	Multiple_Complex	-3.032	0.024
RPL22L1	ribosomal protein L22-like 1	Multiple_Complex	4.007	0.024
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	Multiple_Complex	-4.208	0.024
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	Coding	-6.445	0.024

AL450244.1		Precursor_microRNA	-2.114	0.025
SRF	Jeck2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL, intronic, OVCODE, OVEXON best transcript NM_003131	NonCoding	-2.201	0.026
PSORS1C1	psoriasis susceptibility 1 candidate 1	Multiple_Complex	-2.035	0.026
LINC01088	long intergenic non-protein coding RNA 1088	NonCoding	-2.343	0.026
CTC-512J14.1		Multiple_Complex	2.061	0.027
OR2A4	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 4	Coding	-4.297	0.027
NPNT	nephronectin	Multiple_Complex	8.776	0.028
DQX1	DEAQ box RNA-dependent ATPase 1	Multiple_Complex	-3.165	0.028
ANO10	anoctamin 10	Multiple_Complex	-2.298	0.028
RP1-20N2.6		Multiple_Complex	2.073	0.030
AC007566.10; GATAD1	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 57798; novel transcript, antisense to ERVW-1 and PEX1	NonCoding	-2.453	0.030
NMI	N-myc (and STAT) interactor	Multiple_Complex	-2.586	0.030
AC104058.1		Multiple_Complex	-2.205	0.030
LOC101929565; RP11-61J19.3	uncharacterized LOC101929565; novel transcript	NonCoding	-2.398	0.030
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Multiple_Complex	2.289	0.031
FBXO16	F-box protein 16	Multiple_Complex	2.282	0.032

LURAP1L	leucine rich adaptor protein 1-like	Multiple_Complex	-2.513	0.032
AGMO	alkylglycerol monooxygenase	Multiple_Complex	3.475	0.033
RPL23AP46	ribosomal protein L23a pseudogene 46 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:35894]	Pseudogene	2.065	0.033
DENND2D	DENN/MADD domain containing 2D	Multiple_Complex	-2.243	0.034
ACPP	acid phosphatase, prostate	Multiple_Complex	3.535	0.035
RP11-458N5.1		NonCoding	2.005	0.035
NDC1	NDC1 transmembrane nucleoporin	Multiple_Complex	2.003	0.036
ZBTB38	zinc finger and BTB domain containing 38	Multiple_Complex	-3.344	0.036
LEAP2	liver expressed antimicrobial peptide 2	Multiple_Complex	-2.148	0.036
NDNF	neuron-derived neurotrophic factor	Multiple_Complex	-3.774	0.036
RP4-612B15.2		Pseudogene	2.302	0.037
RP11-268F1.3	putative novel transcript	NonCoding	2.162	0.037
TMEM63B	transmembrane protein 63B	Multiple_Complex	-2.575	0.037
AC012065.5		Multiple_Complex	2.331	0.038
NAPRT	nicotinate phosphoribosyltransferase	Multiple_Complex	-2.625	0.038
HIST1H4C	histone cluster 1, H4c	Coding	2.501	0.038
WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	Multiple_Complex	-2.027	0.039

DMXL1	Dmx-like 1	Multiple_Complex	2.097	0.039
FAM110C	family with sequence similarity 110, member C	Multiple_Complex	-2.395	0.039
AC007881.1		Precursor_microRNA	-2.089	0.039
VEGFC	vascular endothelial growth factor C	Multiple_Complex	2.066	0.040
CTAGE8; CTAGE4	CTAGE family, member 8; CTAGE family, member 4	Coding	-6.503	0.041
CASC9	cancer susceptibility candidate 9 (non-protein coding)	NonCoding	-2.916	0.041
PNPLA8	patatin-like phospholipase domain containing 8	Multiple_Complex	2.543	0.041
PKMP4	pyruvate kinase, muscle pseudogene 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:44246]	Multiple_Complex	2.027	0.041
AC006960.5		Multiple_Complex	2.294	0.042
MRPS21	mitochondrial ribosomal protein S21	Multiple_Complex	7.337	0.042
PLA2R1	phospholipase A2 receptor 1	Multiple_Complex	-2.746	0.043
ERI1	exoribonuclease 1	Multiple_Complex	3.170	0.043
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Multiple_Complex	-3.173	0.044
AC092265.1		Precursor_microRNA	-3.065	0.044
RP11-1029M24.1		Pseudogene	2.172	0.045
ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18	Multiple_Complex	2.212	0.045
RAB23	RAB23, member RAS oncogene family	Multiple_Complex	3.418	0.046

AC108463.2		Multiple_Complex	-2.065	0.046
CAST	calpastatin	Multiple_Complex	-2.193	0.046
RNU6-280P	RNA, U6 small nuclear 280, pseudogene [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:47243]	Small_RNA	-2.187	0.047
ATP5LP2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit G pseudogene 2	Multiple_Complex	2.255	0.047
RP11-337N6.3	novel transcript	NonCoding	-2.216	0.048
RP11-613F7.1		Multiple_Complex	2.860	0.048
DCAF6	DDB1 and CUL4 associated factor 6	Multiple_Complex	-2.162	0.048
PRELID2	PRELI domain containing 2	Multiple_Complex	-2.084	0.048
MIR7111	microRNA 7111	Precursor_microRNA	2.217	0.048
MIR569	microRNA 569	Precursor_microRNA	2.797	0.049
CIR1P2	corepressor interacting with RBPJ, 1 pseudogene 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:44012]	Multiple_Complex	-2.122	0.049
CHDH	choline dehydrogenase	Multiple_Complex	-2.394	0.049

Suplemmentary Table 2. Enrichment analysis of the differential genes detected between metastatic (M) versus normal (N) rectal samples

Term	Overlap	P-value	Combined Score	Genes
Systemic lupus erythematosus_Homo sapiens_hsa05322	32/135	0.0001	16.6312	HIST2H2AA3;HIST2H2AA4;HIST1H2BJ;HIST1H2BI;HIST1H2BK;HIST2H2AC;HIST2H4A;C7;HIST1H2AE;HIST1H3F;HIST1H2AG;HIST1H3B;HIST1H3D; HIST1H2AB;HIST1H2AM;HIST1H2AL;SSB;HIST1H4K;HIST1H2AI;H2AFY;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;H2AFV;HIST2H3A;HIST1H2BE;HIST1H4I;HIST1H2BH;HIST1H4J;HIST1H4C;HIST1H4D;HIST1H4E
M Phase_Homo sapiens_R-HSA-68886	53/268	0.0001	22.6870	HIST2H2AA3;NCAPG2;SMC4;HIST2H2AC;LMNB1;CDC20;PSMD6;SGOL2;PTTG1;FBXO5;SPDL1;HIST1H2AB;NDC1;H2AFZ;HIST1H2AJ;UBE2E1;PSMA5;HIST2H3A;KIF2A;GORASP2;PSMA2;KIF2C;HIST1H2BH;KIF20A;ANAPC1;ITGB3BP;NUP205;PSMD14;HIST1H2BJ;HIST1H2BK;NCAPG;NCAPH;ANAPC10;CCNB1;RAD21;TPR;NUP43;BUB1;CENPU;NUP155;RCC2;H3F3A;PSMB8;CENPE;CENPF;CENPH;PSMC1;PSMC2;CENPK;NUP35;NUPL2;SPC25;MAD2L1
Cell Cycle, Mitotic_Homo sapiens_R-HSA-69278	81/462	0.0001	21.8480	HIST2H2AA3;MCM7;NCAPG2;GMNN;SMC4;HIST2H2AC;LMNB1;CKS1B;PPP1CB;CDC20;PSMD6;SGOL2;PTTG1;MYC;NEK2;FBXO5;SPDL1;SKP2;HIST1H2AB;NDC1;RFC4;H2AFZ;HIST1H2AJ;UBE2E1;CDC25C;TUBA4A;PSMA5;CCNA2;DBF4;HIST2H3A;KIF2A;PSMA2;GORASP2;MCM3;KIF2C;HIST1H2BH; MCM6;KIF20A;PPP1R12B;ANAPC1;ITGB3BP;MCM2;NUP205;PSMD14; HIST1H2BJ;HIST1H2BK;CUL1;NCAPG;LIN9;NCAPH;ANAPC10;ORC5;ORC4;CCNB1;RAD21;TPR;POLD2;NUP43;BUB1;CEP78;PLK4;CENPU;RRM2;NUP155;RCC2;H3F3A;PSMB8;DHFR;CENPE;CENPF;CDK7;CENPH;PSMC1;RPA3;PSMC2;CENPK;FGFR1OP;NUP35;NUPL2;MAD2L1;SPC25

B-WICH complex positively regulates rRNA expression_Homo sapiens_R-HSA-5250924	17/58	0.0003	16.4039	HIST2H2AA3;GSK3B;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMARCA5;DEK;HIST2H2AC;KAT2B;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
Respiratory electron transport_Homo sapiens_R-HSA-611105	22/88	0.0004	15.1570	NDUFB9;NDUFA4;NDUFB4;ACAD9;NDUFB3;NDUFA2;NDUFB2;SDHC;COX6C;COX5B;SDHB;COX7C;LRPPRC;COX7A2L;NDUFS6;UQCRQ;NDUFAF7;NDUFAF4;UQCRC1;NDUFAF2;CYCS;COX20
Transcriptional regulation by small RNAs_Homo sapiens_R-HSA-5578749	19/72	0.0005	15.2838	NDC1;HIST2H2AA3;NUP205;NUP155;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST2H2AC;HIST2H3A;TPR;NUP35;NUP43;HIST1H2BH;NUPL2;POLR2J;POLR2K;HIST1H2AB
Cell Cycle_Homo sapiens_R-HSA-1640170	93/566	0.0005	18.3691	HIST2H2AA3;PRDM9;MCM7;NCAPG2;GMNN;SMC4;HIST2H2AC;LMNB1;CKS1B;PPP1CB;CDC20;PSMD6;SGOL2;SUMO1;PTTG1;YWHAQ;MYC;NEK2;FBXO5;SPDL1;TOPBP1;SKP2;HIST1H2AB;NDC1;RFC4;RMI1;H2AFZ;HIST1H2AJ;UBE2E1;CDC25C;YWHAZ;TUBA4A;PSMA5;CCNA2;DBF4;HIST2H3A;KIF2A;PSMA2;GORASP2;UBE2V2;MCM3;KIF2C;HIST1H2BH;MCM6;KIF20A;PPP1R12B;ANAPC1;ITGB3BP;MCM2;NUP205;PSMD14;HIST1H2BJ;HIST1H2BK;CUL1;NCAPG;LIN9;NCAPH;ANAPC10;ORC5;ORC4;CCNB1;RAD21;TPR;POLD2;NUP43;BUB1;CEP78;PLK4;BARD1;CENPU;NPM1;RRM2;NUP155;RCC2;H3F3A;SMARCA5;MND1;PSMB8;DHFR;CENPE;CENPF;CDK7;CENPH;RFWD2;PSMC1;RPA3;PSMC2;CENPK;FGFR1OP;NUP35;NUPL2;MAD2L1;SPC25
Mitochondrial translation initiation_Homo sapiens_R-HSA-5368286	21/84	0.0006	14.9381	PTCD3;MRPS17;MRPS28;MRPS27;MRPS24;MRPS14;MRPS22;MRPS33;MRPS18B;MTIF2;MRPL36;MRPL47;MRPL15;MRPS30;MRPL24;MRPL13;MRPL32;MRPL22;MRPL3;MRPL1;MRPL9
Condensation of Prophase Chromosomes_Homo sapiens_R-HSA-2299718	13/41	0.0006	14.9613	HIST2H2AA3;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;HIST1H2BK;NCAPG2;SMC4;HIST2H2AC;CCNB1;HIST2H3A;HIST1H2BH;HIST1H2AB

Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins._Homo sapiens_R-HSA-163200	25/109	0.0007	13.9519	NDUFB9;NDUFB4;NDUFB3;NDUFB2;ATP5G3;COX5B;COX7C;NDUFA4;ACAD9;NDUFA2;SDHC;ATP5F1;COX6C;SDHB;LRPPRC;ATP5J2;COX7A2L;UQCRQ;NDUFAF7;NDUFS6;NDUFAF4;UQCRC1;NDUFAF2;CYCS;COX20
Spliceosome_Homo sapiens_hsa03040	29/134	0.0008	12.6664	ISY1;SF3B5;SF3B6;USP39;TRA2B;MAGOH;TRA2A;DHX15;SRSF10;PPIL1;NCBP1;PRPF40A;THOC3;PLRG1;LSM5;LSM3;CDC40;U2SURP;LSM2;LSM8;LSM6;SNRPG;SRSF3;PPIH;SNRPE;SNRPC;SNRNP200;SRSF7;RBM22
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport_Homo sapiens_R-HSA-1428517	32/153	0.0008	13.5864	NDUFB9;FH;NDUFB4;GLO1;NDUFB3;NDUFB2;ATP5G3;COX5B;COX7C;MPC2;PDK1;MDH2;NDUFA4;ACAD9;NDUFA2;SDHC;ATP5F1;COX6C;SDHB; LRPPRC;ATP5J2;COX7A2L;UQCRQ;NDUFAF7;NDUFS6;NDUFAF4;UQCRC1;NDUFAF2;CYCS;SUCLG1;DLD;COX20
Cell cycle_Homo sapiens_hsa04110	27/124	0.0011	11.5206	GSK3B;HDAC2;MCM7;PRKDC;CUL1;TTK;ANAPC10;CDC20;ORC5;ORC4;CCNB1;PTTG1;YWHAQ;MYC;RAD21;SKP2;BUB1;CDC25C;YWHAZ;CCNA2; CDK7;DBF4;MCM3;MCM6;ANAPC1;MAD2L1;MCM2
G1/S Transition_Homo sapiens_R-HSA-69206	25/112	0.0011	14.0144	MCM7;PSMD14;CUL1;CKS1B;ORC5;ORC4;PSMD6;CCNB1;MYC;FBXO5;SKP2;RRM2;PSMB8;DHFR;CCNA2;PSMA5;CDK7;DBF4;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
RHO GTPases activate PKNs_Homo sapiens_R-HSA-5625740	16/60	0.0012	12.5274	HIST2H2AA3;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;CDC25C;YWHAZ;HIST2H2AC;PPP1CB;HIST2H3A;YWHAQ;HIST1H2BH;RAC1;PPP1R12B;HIST1H2AB
Mitochondrial translation termination_Homo sapiens_R-HSA-5419276	20/84	0.0015	12.8632	PTCD3;MRPS17;MRPS28;MRPS27;MRPS24;MRPS14;MRPS22;MRPS33;MRPS18B;MRPL36;MRPL47;MRPL15;MRPS30;MRPL24;MRPL13;MRPL32;MRPL22;MRPL3;MRPL1;MRPL9
Mitochondrial translation elongation_Homo sapiens_R-HSA-5389840	20/84	0.0015	12.8580	PTCD3;MRPS17;MRPS28;MRPS27;MRPS24;MRPS14;MRPS22;MRPS33;MRPS18B;MRPL36;MRPL47;MRPL15;MRPS30;MRPL24;MRPL13;MRPL32;MRPL22;MRPL3;MRPL1;MRPL9

Mitochondrial translation_Homo sapiens_R-HSA-5368287	21/90	0.0015	12.9305	PTCD3;MRPS17;MRPS28;MRPS27;MRPS24;MRPS14;MRPS22;MRPS33;MRPS18B;MTIF2;MRPL36;MRPL47;MRPL15;MRPS30;MRPL24;MRPL13;MRPL32;MRPL22;MRPL3;MRPL1;MRPL9
PRC2 methylates histones and DNA_Homo sapiens_R-HSA-212300	12/40	0.0016	12.2176	HIST2H2AA3;HIST2H3A;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;MTF2;HIST1H2BK;HIST1H2BH;EZH2;HIST2H2AC;HIST1H2AB
RNA Polymerase I Promoter Opening_Homo sapiens_R-HSA-73728	10/30	0.0016	11.5398	HIST2H2AA3;HIST2H3A;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
Positive epigenetic regulation of rRNA expression_Homo sapiens_R-HSA-5250913	18/73	0.0016	11.1009	HIST2H2AA3;GSK3B;HDAC2;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMARCA5;DEK;HIST2H2AC;KAT2B;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
Alcoholism_Homo sapiens_hsa05034	35/179	0.0017	11.6982	HIST2H2AA3;HDAC2;HIST2H2AA4;HDAC3;HIST1H2BJ;HIST1H2BI;HIST1H2BK;HIST2H2AC;PPP1CB;HIST2H4A;GNG5;HIST1H2AE;HIST1H3F;HIST1H2AG;HIST1H3B;HIST1H3D;HIST1H2AB;HIST1H2AM;HIST1H2AL;HIST1H4K;HIST1H2AI;H2AFY;H2AFZ; H3F3A;HIST1H2AJ;H2AFV;HIST2H3A;HAT1;HIST1H2BE;HIST1H4I;HIST1H2BH;HIST1H4J;HIST1H4C;HIST1H4D;HIST1H4E
Deposition of new CENPA-containing nucleosomes at the centromere_Homo sapiens_R-HSA-606279	14/52	0.0021	12.0089	HIST2H2AA3;CENPU;NPM1;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ; HIST1H2BK;SMARCA5;HIST2H2AC;CENPH;CENPK;HIST1H2BH;ITGB3BP;HIST1H2AB
Nucleosome assembly_Homo sapiens_R-HSA-774815	14/52	0.0021	11.9686	HIST2H2AA3;CENPU;NPM1;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ; HIST1H2BK;SMARCA5;HIST2H2AC;CENPH;CENPK;HIST1H2BH;ITGB3BP;HIST1H2AB

Cell Cycle Checkpoints_Homo sapiens_R-HSA-69620	35/182	0.0022	13.3868	MCM7;PSMD14;HIST1H2BJ;HIST1H2BK;ANAPC10;CDC20;ORC5;ORC4;PSMD6;CCNB1;YWHAQ;SUMO1;TOPBP1;BARD1;RFC4;RMI1;UBE2E1;CDC25C;YWHAZ;PSMB8;CCNA2;PSMA5;DBF4;RFWD2;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;MCM3;UBE2V2;HIST1H2BH;MCM6;ANAPC1;MAD2L1;MCM2
DNA methylation_Homo sapiens_R-HSA-5334118	10/32	0.0028	10.3913	HIST2H2AA3;HIST2H3A;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
Gene Silencing by RNA_Homo sapiens_R-HSA-211000	22/101	0.0029	11.4880	TSNAX;NDC1;HIST2H2AA3;NUP205;NUP155;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A; HIST1H2AJ;HIST1H2BK;TSN;HIST2H2AC;HIST2H3A;TPR;DROSHA;NUP35;NUP43;HIST1H2BH;NUPL2;POLR2J;POLR2K; HIST1H2AB
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA_Homo sapiens_R-HSA-72203	36/193	0.0033	11.2413	FYTTD1;SF3B5;SLBP;NUP205;DHX9;SF3B6;USP39;TRA2B; MAGOH;TPR;NUP43;POLR2J;POLR2K;NDC1;CHTOP;NUP155;NCBP1;CPSF3;THOC3;PLRG1;LSM5;LSM3;CDC40;LSM2;LSM8;LSM6;HNRNPA2B1;SNRPG;SRSF3;NUP35;PPIH;SNRPE;DNAJC8;NUPL2;SNRNP200;SRSF7
Folding of actin by CCT/TriC_Homo sapiens_R-HSA-390450	5/10	0.0034	4.6491	CCT3;CCT6A;CCT7;CCT5;CCT4
Protein export_Homo sapiens_hsa03060	8/23	0.0035	7.4880	SRP19;SPCS3;SPCS1;SRP72;SEC61G;SRPRB;SRP9;SEC63
APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins_Homo sapiens_R-HSA-174143	19/85	0.0041	11.3497	PSMD14;UBE2E1;CUL1;ANAPC10;PSMB8;CDC20;CCNA2;PSMA5;PSMD6;CCNB1;PTTG1;PSMA2;PSMC1;PSMC2;NEK2; FBXO5;SKP2;ANAPC1;MAD2L1
Regulation of mitotic cell cycle_Homo sapiens_R-HSA-453276	19/85	0.0041	11.2935	PSMD14;UBE2E1;CUL1;ANAPC10;PSMB8;CDC20;CCNA2;PSMA5;PSMD6;CCNB1;PTTG1;PSMA2;PSMC1;PSMC2;NEK2; FBXO5;SKP2;ANAPC1;MAD2L1
Metabolism of non-coding RNA_Homo sapiens_R-HSA-194441	13/50	0.0042	9.5234	NDC1;NUP205;NCBP1;NUP155;DDX20;PHAX;TPR;SNRPG;NUP35;SNRPE;NUP43;GEMIN6;NUPL2
snRNP Assembly_Homo sapiens_R-	13/50	0.0042	9.4724	NDC1;NUP205;NCBP1;NUP155;DDX20;PHAX;TPR;SNRPG;N

HSA-191859				UP35;SNRPE;NUP43;GEMIN6;NUPL2
Activated PKN1 stimulates transcription of AR (androgen receptor) regulated genes KLK2 and KLK3_Homo sapiens_R-HSA-5625886	10/34	0.0045	9.0128	HIST2H2AA3;HIST2H3A;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm_Homo sapiens_R-HSA-72202	17/74	0.0048	9.2599	NDC1;FYTTD1;SLBP;CHTOP;NUP205;NCBP1;NUP155;CPSF3;THOC3;CDC40;MAGOH;TPR;SRSF3;NUP35;NUP43;NUPL2;SRSF7
RNA Polymerase I Chain Elongation_Homo sapiens_R-HSA-73777	14/57	0.0053	9.0290	HIST2H2AA3;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST2H2AC;CDK7;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
SIRT1 negatively regulates rRNA Expression_Homo sapiens_R-HSA-427359	10/35	0.0057	9.0090	HIST2H2AA3;HIST2H3A;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
Mitotic Prophase_Homo sapiens_R-HSA-68875	22/107	0.0061	9.2003	NDC1;HIST2H2AA3;NUP205;NUP155;HIST1H2BJ;H2AFZ;NCAPG2;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMC4;HIST2H2AC;LMNB1;CCNB1;HIST2H3A;GORASP2;TPR;NUP35;NUP43;HIST1H2BH;NUPL2; HIST1H2AB
Activation of anterior HOX genes in hindbrain development during early embryogenesis_Homo sapiens_R-HSA-5617472	19/89	0.0069	8.3644	HIST2H2AA3;PAXIP1;HDAC3;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST2H2AC;CNOT6;MEIS1;HIST2H3A;RBBP5;RQCD1;HIST1H2BH;POLR2J;POLR2K;HIST1H2AB;EZH2
Activation of HOX genes during differentiation_Homo sapiens_R-HSA-5619507	19/89	0.0069	8.3170	HIST2H2AA3;PAXIP1;HDAC3;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST2H2AC;CNOT6;MEIS1;HIST2H3A;RBBP5;RQCD1;HIST1H2BH;POLR2J;POLR2K;HIST1H2AB;EZH2

TP53 regulates transcription of additional cell cycle genes whose exact role in the p53 pathway remain uncertain_Homo sapiens_R-HSA-6804115	7/21	0.0080	5.6817	NPM1;CNOT6;CNOT7;CNOT11;RQCD1;CDC25C;CNOT8
Mitotic G1-G1/S phases_Homo sapiens_R-HSA-453279	26/136	0.0083	8.7615	MCM7;PSMD14;CUL1;LIN9;CKS1B;ORC5;ORC4;PSMD6;CCNB1;MYC;FBXO5;SKP2;RRM2;PSMB8;DHFR;CCNA2;PSMA5;CDK7;DBF4;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
Meiotic recombination_Homo sapiens_R-HSA-912446	13/54	0.0085	8.3377	HIST2H2AA3;PRDM9;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;MND1;HIST2H2AC;HIST2H3A;RPA3;HIST1H2BH;HIST1H2AB
Activation of ATR in response to replication stress_Homo sapiens_R-HSA-176187	10/37	0.0086	7.1736	ORC5;ORC4;RFC4;DBF4;MCM7;RPA3;MCM3;MCM6;CDC25C;MCM2
G2/M Checkpoints_Homo sapiens_R-HSA-69481	28/150	0.0087	9.4580	MCM7;PSMD14;HIST1H2BJ;HIST1H2BK;ORC5;ORC4;PSMD6;CCNB1;YWHAQ;SUMO1;TOPBP1;BARD1;RFC4;RMI1;CDC25C;YWHAZ;PSMB8;PSMA5;DBF4;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;MCM3;UBE2V2;HIST1H2BH;MCM6;MCM2
ERCC6 (CSB) and EHMT2 (G9a) positively regulate rRNA expression_Homo sapiens_R-HSA-427389	11/43	0.0093	6.3275	HIST2H2AA3;HDAC2;HIST2H3A;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;H3F3A;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
Nuclear import of Rev protein_Homo sapiens_R-HSA-180746	9/32	0.0095	6.8901	NDC1;NPM1;NUP205;NUP155;TPR;NUP35;RCC1;NUP43;NUPL2
NoRC negatively regulates rRNA expression_Homo sapiens_R-HSA-427413	16/73	0.0097	7.1516	HIST2H2AA3;HDAC2;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMARCA5;HIST2H2AC;CDK7;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
Transport of Mature mRNAs Derived from Intronless Transcripts_Homo sapiens_R-HSA-159234	10/38	0.0105	6.8047	NDC1;SLBP;NUP205;NCBP1;NUP155;CPSF3;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2

APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins_Homo sapiens_R-HSA-176409	16/74	0.0110	8.2310	PSMD14;UBE2E1;ANAPC10;PSMB8;CDC20;CCNA2;PSMA5;PSMD6;CCNB1;PTTG1;PSMA2;PSMC1;PSMC2;NEK2;ANAPC1;MAD2L1
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript_Homo sapiens_R-HSA-159236	15/68	0.0113	7.2013	NDC1;FYTTD1;CHTOP;NUP205;NCBP1;NUP155;THOC3;CDC40;MAGOH;TPR;SRSF3;NUP35;NUP43;NUPL2;SRSF7
Deadenylation-dependent mRNA decay_Homo sapiens_R-HSA-429914	12/50	0.0115	6.1481	EXOSC7;CNOT6;CNOT7;LSM6;CNOT11;EXOSC9;RQCD1;CNOT8;LSM5;LSM3;LSM2;PAIP1
Mitotic Prometaphase_Homo sapiens_R-HSA-68877	21/107	0.0123	7.2482	CENPU;RCC2;NCAPG;SMC4;NCAPH;CDC20;CENPE;CCNB1;CENPF;SGOL2;KIF2A;CENPH;RAD21;CENPK;KIF2C;NUP43;SPDL1;BUB1;ITGB3BP;MAD2L1;SPC25
Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins_Homo sapiens_R-HSA-176814	16/75	0.0125	7.6582	PSMD14;UBE2E1;ANAPC10;PSMB8;CDC20;CCNA2;PSMA5;PSMD6;CCNB1;PTTG1;PSMA2;PSMC1;PSMC2;NEK2;ANAPC1;MAD2L1
mRNA Splicing - Major Pathway_Homo sapiens_R-HSA-72163	25/134	0.0128	6.9467	SF3B5;DHX9;SF3B6;USP39;TRA2B;MAGOH;POLR2J;POLR2K;NCBP1;CPSF3;PLRG1;LSM5;LSM3;CDC40;LSM2;LSM8;LSM6;HNRNPA2B1;SNRPG;SRSF3;PPIH;SNRPE;DNAJC8;SNRNP200;SRSF7
RNA Polymerase I Promoter Clearance_Homo sapiens_R-HSA-73854	16/76	0.0142	6.4688	HIST2H2AA3;HDAC2;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST2H2AC;KAT2B;CDK7;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
Negative epigenetic regulation of rRNA expression_Homo sapiens_R-HSA-5250941	16/76	0.0142	6.2734	HIST2H2AA3;HDAC2;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMARCA5;HIST2H2AC;CDK7;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
Transport of the SLBP Dependant Mature mRNA_Homo sapiens_R-HSA-159230	9/34	0.0143	5.6997	NDC1;SLBP;NUP205;NCBP1;NUP155;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2
Integration of provirus_Homo	4/9	0.0147	-4.3865	XRCC4;XRCC5;PPIA;KPNA1

sapiens_R-HSA-162592				
RHO GTPase Effectors_Homo sapiens_R-HSA-195258	42/255	0.0149	7.6276	HIST2H2AA3;HIST1H2BJ;HIST1H2BK;KIF14;HIST2H2AC;CDC20;PPP1CB;CDC42;SGOL2;YWHAQ;CTNNA1;NUP43;RAC1;SPDL1;BUB1;HIST1H2AB;ACTR3;CENPU;ACTR2;H2AFZ;RCC2;H3F3A;HIST1H2AJ;ARPC4;ARPC5;CDC25C;YWHAZ;PTK2;CENPE;CENPF;HIST2H3A;CENPH;KIF2A;ARPC2;CENPK;KIF2C;HIST1H2BH;PPP1R12B;CFTR;ITGB3BP; SPC25;MAD2L1
RNA degradation_Homo sapiens_hsa03018	16/77	0.0160	7.0733	HSPA9;ZCCHC7;ENO1;LSM5;LSM3;LSM2;HSPD1;EXOSC7;LSM8;CNOT6;CNOT7;LSM6;EXOSC9;RQCD1;CNOT8;SKIV2L2
TP53 Regulates Metabolic Genes_Homo sapiens_R-HSA-5628897	17/84	0.0171	6.0988	NDUFA4;COX6C;COX5B;COX7C;YWHAZ;LRPPRC;PRKAG3;GLS;COX7A2L;RRM2B;YWHAQ;PRDX1;AKT3;CYCS;LAMTOR2;COX20;LAMTOR5
Interactions of Rev with host cellular proteins_Homo sapiens_R-HSA-177243	9/35	0.0173	5.5253	NDC1;NPM1;NUP205;NUP155;TPR;NUP35;RCC1;NUP43;NUPL2
S Phase_Homo sapiens_R-HSA-69242	23/124	0.0176	6.9673	RFC4;MCM7;PSMD14;CUL1;PSMB8;CKS1B;CCNA2ORC5;PSMA5;ORC4;PSMD6;CDK7;PSMA2;PSMC1;MYC;RAD21;RPA3;PSMC2;POLD2;MCM3;MCM6;SKP2;MCM2
Citric acid cycle (TCA cycle)_Homo sapiens_R-HSA-71403	6/19	0.0183	2.4179	FH;MDH2;SDHC;SUCLG1;SDHB;DLD
Removal of licensing factors from origins_Homo sapiens_R-HSA-69300	15/72	0.0188	6.6581	MCM7;PSMD14;GMNN;PSMB8;ORC5;CCNA2; PSMA5;ORC4;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2; MCM3;MCM6;MCM2
Transport of Ribonucleoproteins into the Host Nucleus_Homo sapiens_R-HSA-168271	8/30	0.0196	4.2859	NDC1;NUP205;NUP155;TPR;NUP35; NUP43;NUPL2;KPNA1
Activation of the pre-replicative complex_Homo sapiens_R-HSA-68962	8/30	0.0196	3.9631	ORC5;ORC4;DBF4;MCM7;RPA3;MCM3;MCM6;MCM2

Mitotic Metaphase and Anaphase_Homo sapiens_R-HSA-2555396	30/174	0.0201	7.0447	PSMD14;ANAPC10;LMNB1;CDC20;PSMD6;SGOL2;PTTG1;RAD21;NUP43;FBXO5;SPDL1;BUB1;CENPU;RCC2;UBE2E1;PSMB8;PSMA5;CENPE;CENPF;KIF2A;CENPH;PSMA2;PSMC1;PSMC2;CENPK;KIF2C;ANAPC1;ITGB3BP;MAD2L1;SPC25
Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase_Homo sapiens_R-HSA-176408	16/79	0.0202	6.3573	PSMD14;UBE2E1;CUL1;ANAPC10;PSMB8;CDC20;CCNA2;PSMA5;PSMD6;CCNB1;PSMA2;PSMC1;PSMC2;FBXO5;ANAPC1;MAD2L1
RNA Polymerase I Transcription_Homo sapiens_R-HSA-73864	16/79	0.0202	5.5452	HIST2H2AA3;HDAC2;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST2H2AC;KAT2B;CDK7;ZNRD1;HIST2H3A;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB
Mitochondrial protein import_Homo sapiens_R-HSA-1268020	12/54	0.0209	4.3827	HSPA9;DNAJC19;COQ2;CHCHD2;GRPEL1;COX17 TIMM17A;PMPCB;VDAC1;TOMM20;FXN;HSPD1
Oxidative phosphorylation_Homo sapiens_hsa00190	24/133	0.0212	6.4422	NDUFB9;NDUFA4;NDUFB4;COX17;NDUFB3;NDUFA2;NDUFB2;SDHC;COX7A2;ATP5G3;ATP5F1;COX6C;COX5B;SDHB;COX7C;UQCRHL;ATP5J2;COX7A2L;UQCRQ;NDUFS6;UQCRC1;ATP6V1H;ATP6V1C1;ATP6V1F
Chromosome Maintenance_Homo sapiens_R-HSA-73886	17/86	0.0213	5.6584	HIST2H2AA3;CENPU;NPM1;RFC4;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMARCA5;HIST2H2AC;CENPH;RPA3;CENPK;POLD2;HIST1H2BH;ITGB3BP;HIST1H2AB
Assembly of the pre-replicative complex_Homo sapiens_R-HSA-68867	14/67	0.0222	6.0829	MCM7;PSMD14;GMNN;PSMB8;ORC5;PSMA5;ORC4;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
Separation of Sister Chromatids_Homo sapiens_R-HSA-2467813	28/162	0.0234	6.4722	PSMD14;ANAPC10;CDC20;PSMD6;SGOL2;PTTG1;RAD21;NUP43;SPDL1;BUB1;CENPU;RCC2;UBE2E1;PSMB8;PSMA5;CENPE;CENPF;KIF2A;CENPH;PSMA2;PSMC1;PSMC2;CENPK;KIF2C;ANAPC1;ITGB3BP;MAD2L1;SPC25
Packaging Of Telomere Ends_Homo sapiens_R-HSA-171306	8/31	0.0238	3.4740	HIST2H2AA3;HIST1H2BJ;H2AFZ;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
Phosphorylation of Emi1_Homo	3/6	0.0247	-6.9134	CDC20;CCNB1;FBXO5

sapiens_R-HSA-176417				
Transport of Mature mRNA Derived from an Intronless Transcript_Homo sapiens_R-HSA-159231	9/37	0.0247	3.9437	NDC1;NUP205;NCBP1;NUP155;CPSF3;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2
Epigenetic regulation of gene expression_Homo sapiens_R-HSA-212165	21/115	0.0264	5.0212	HIST2H2AA3;GSK3B;HDAC2;HIST1H2BJ;H2AFZ;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;SMARCA5;DEK;HIST2H2AC;KAT2B;CDK7;ZNRD1;HIST2H3A;MTF2;POLR1C;HIST1H2BH;POLR2K;HIST1H2AB;EZH2
Regulation of DNA replication_Homo sapiens_R-HSA-69304	15/75	0.0266	5.7342	MCM7;PSMD14;GMNN;PSMB8;ORC5;CCNA2;PSMA5;ORC4;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
Host Interactions of HIV factors_Homo sapiens_R-HSA-162909	23/129	0.0270	5.8745	NDC1;NUP205;NPM1;NUP155;PSMD14;PSMB8;PSMA5;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2;TPR;AP1S1;RCC1;ATP6V1H;NUP35;TCEB1;NUP43;AP1S3;RAC1;NUPL2;PPIA;KPNA1
DNA Replication Pre-Initiation_Homo sapiens_R-HSA-69002	16/82	0.0279	5.6097	MCM7;PSMD14;GMNN;PSMB8;ORC5;PSMA5;ORC4;PSMD6;DBF4;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
M/G1 Transition_Homo sapiens_R-HSA-68874	16/82	0.0279	5.5754	MCM7;PSMD14;GMNN;PSMB8;ORC5;PSMA5;ORC4;PSMD6;DBF4;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
Vpr-mediated nuclear import of PICs_Homo sapiens_R-HSA-180910	8/32	0.0285	3.1242	NDC1;NUP205;NUP155;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2;KPNA1
mRNA Splicing_Homo sapiens_R-HSA-72172	25/144	0.0294	4.8921	SF3B5;DHX9;SF3B6;USP39;TRA2B;MAGOH;POLR2J;POLR2K;NCBP1;CPSF3;PLRG1;LSM5;LSM3;CDC40;LSM2;LSM8;LSM6;HNRNPA2B1;SNRPG;SRSF3;PPIH;SNRPE;DNAJC8;SNRNP200;SRSF7
Mitotic Anaphase_Homo sapiens_R-HSA-68882	29/173	0.0309	5.7440	PSMD14;ANAPC10;LMNB1;CDC20;PSMD6;SGOL2;PTTG1;RAD21;NUP43;SPDL1;BUB1;CENPU;RCC2;UBE2E1;PSMB8;PSMA5;CENPE;CENPF;KIF2A;CENPH;PSMA2;PSMC1;PSMC2;CENPK;KIF2C;ANAPC1;ITGB3BP;MAD2L1;SPC25

Orc1 removal from chromatin_Homo sapiens_R-HSA-68949	14/70	0.0315	4.8330	MCM7;PSMD14;PSMB8;ORC5;CCNA2;PSMA5;ORC4;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
Switching of origins to a post-replicative state_Homo sapiens_R-HSA-69052	14/70	0.0315	4.7915	MCM7;PSMD14;PSMB8;ORC5;CCNA2;PSMA5;ORC4;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2;MCM3;MCM6;MCM2
Condensation of Prometaphase Chromosomes_Homo sapiens_R-HSA-2514853	4/11	0.0318	-3.6090	CCNB1;NCAPG;SMC4;NCAPH
SLBP Dependent Processing of Replication-Dependent Histone Pre-mRNAs_Homo sapiens_R-HSA-77588	4/11	0.0318	-5.2373	SLBP;NCBP1;SNRPG;SNRPE
SUMOylation of RNA binding proteins_Homo sapiens_R-HSA-4570464	10/45	0.0334	3.5274	NDC1;NOP58;NUP205;NUP155;SUMO1;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2;RNF2
Rev-mediated nuclear export of HIV RNA_Homo sapiens_R-HSA-165054	8/33	0.0339	2.8641	NDC1;NUP205;NUP155;TPR;NUP35;RCC1;NUP43;NUPL2
Transport of the SLBP independent Mature mRNA_Homo sapiens_R-HSA-159227	8/33	0.0339	2.6559	NDC1;NUP205;NCBP1;NUP155;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2
NS1 Mediated Effects on Host Pathways_Homo sapiens_R-HSA-168276	9/39	0.0340	3.3129	NDC1;NUP205;NUP155;TPR;EIF2AK2;NUP35;NUP43;NUPL2;KPNA1
rRNA modification in the nucleus_Homo sapiens_R-HSA-6790901	12/58	0.0351	3.3284	UTP15;NOP58;RPS7;HEATR1;GAR1;WBSCR22;WDR75;RRP36;DIEXF;WDR43;DCAF13;RRP9
Formation of the beta-catenin:TCF transactivating complex_Homo sapiens_R-HSA-201722	12/58	0.0351	2.8743	HIST2H2AA3;HIST2H3A;HIST1H2BJ;RBBP5;H2AFZ;MYC;H3F3A;HIST1H2AJ;HIST1H2BK;HIST1H2BH;HIST2H2AC;HIST1H2AB
DNA Replication_Homo sapiens_R-HSA-69306	19/105	0.0364	4.8984	RFC4;MCM7;PSMD14;GMNN;PSMB8;CCNA2;ORC5;PSMA5;ORC4;PSMD6;DBF4;PSMA2;PSMC1;RPA3;PSMC2;POLD2;MCM3;MCM6;MCM2
Nonhomologous End-Joining (NHEJ)_Homo sapiens_R-HSA-5693571	11/52	0.0368	3.5382	BARD1;PAXIP1;XRCC4;HIST1H2BJ;RIF1;SUMO1;XRCC5;PRKDC;HIST1H2BK;UBE2V2;HIST1H2BH

APC:Cdc20 mediated degradation of cell cycle proteins prior to satisfation of the cell cycle checkpoint_Homo sapiens_R-HSA-179419	14/72	0.0391	4.3527	PSMD14;UBE2E1;ANAPC10;PSMB8;CDC20;CCNA2;PSMA5;PSMD6;PSMA2;PSMC1;PSMC2;NEK2;ANAPC1;MAD2L1
Resolution of Sister Chromatid Cohesion_Homo sapiens_R-HSA-2500257	18/99	0.0392	4.1358	CENPU;RCC2;CDC20;CENPE;CCNB1;CENPF;SGOL2;KIF2A;CENPH;RAD21;CENPK;KIF2C;NUP43;SPDL1;BUB1;ITGB3BP;MAD2L1;SPC25
Nuclear Pore Complex (NPC) Disassembly_Homo sapiens_R-HSA-3301854	8/34	0.0399	2.5732	NDC1;NUP205;CCNB1;NUP155;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2
Parkinson's disease_Homo sapiens_hsa05012	24/142	0.0426	5.0532	NDUFB9;NDUFA4;NDUFB4;NDUFB3;NDUFA2;NDUFB2;SDHC;COX7A2;ATP5G3;ATP5F1;COX6C;COX5B;SDHB;COX7C;UQCRHL;COX7A2L;UQCRQ;NDUFS6;CASP3;UQCRC1;VDAC3;CYCS;VDAC1;SNCA
HIV Infection_Homo sapiens_R-HSA-162906	35/222	0.0432	4.7964	NUP205;PSMD14;TAF9;GTF2E2;PSMD6;TPR;AP1S1;RCC1;ATP6V1H;TCEB1;NUP43;AP1S3;RAC1;POLR2J;POLR2K;KPNA1;NDC1;NPM1;RNGTT;XRCC4;NUP155;NCBP1;XRCC5;VTA1;PSMB8;PSMA5;CDK7;PSMA2;PSMC1;PSMC2;CHMP4C;NUP35;NUPL2;PPIA;TAF2
Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex_Homo sapiens_R-HSA-75035	4/12	0.0434	-4.4008	CCNB1;YWHAQ;CDC25C;YWHAZ
Purine ribonucleoside monophosphate biosynthesis_Homo sapiens_R-HSA-73817	4/12	0.0434	-5.5027	ATIC;GMPS;PAICS;ADSS
Unwinding of DNA_Homo sapiens_R-HSA-176974	4/12	0.0434	-7.4485	MCM7;MCM3;MCM6;MCM2
Cleavage of Growing Transcript in the Termination Region_Homo sapiens_R-HSA-109688	12/60	0.0444	2.7416	FYTTD1;SLBP;CHTOP;NCBP1;CPSF3;MAGOH;SNRPG;SRSF3;SNRPE;THOC3;SRSF7;CDC40
Post-Elongation Processing of the Transcript_Homo sapiens_R-HSA-76044	12/60	0.0444	2.7085	FYTTD1;SLBP;CHTOP;NCBP1;CPSF3;MAGOH;SNRPG;SRSF3;SNRPE;THOC3;SRSF7;CDC40

RNA Polymerase II Transcription Termination_Homo sapiens_R-HSA-73856	12/60	0.0444	2.6690	FYTTD1;SLBP;CHTOP;NCBP1;CPSF3;MAGOH;SNRPG;SRSF3;SNRPE;THOC3;SRSF7;CDC40
Host Interactions with Influenza Factors_Homo sapiens_R-HSA-168253	9/41	0.0454	2.4417	NDC1;NUP205;NUP155;TPR;EIF2AK2;NUP35;NUP43;NUPL2;KPNA1
Deadenylation of mRNA_Homo sapiens_R-HSA-429947	6/23	0.0454	-0.9481	CNOT6;CNOT7;CNOT11;RQCD1;CNOT8;PAIP1
Mismatch repair_Homo sapiens_hsa03430	6/23	0.0454	3.0224	RFC4;MSH2;RPA3;POLD2;PMS2;SSBP1
Interactions of Vpr with host cellular proteins_Homo sapiens_R-HSA-176033	8/35	0.0466	1.7999	NDC1;NUP205;NUP155;TPR;NUP35;NUP43;NUPL2;KPNA1
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)_Homo sapiens_hsa04932	25/151	0.0483	5.2433	GSK3B;NDUFB9;NDUFB4;NDUFB3;NDUFB2;COX7A2;COX5B;COX7C;PRKAG3;CDC42;CASP3;AKT3;RAC1;IL6R;NDUFA4;NDUFA2;SDHC;COX6C;SDHB;UQCRHL;COX7A2L;UQCRQ;NDUFS6;UQCRC1;CYCS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de alterações no transcritoma associadas à progressão metastática em adenocarcinoma de reto.

Pesquisador: Iael Weissberg Minutentag

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 62215416.7.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.882.307

Apresentação do Projeto:

Tratam os autos de emenda na qual as pesquisadoras solicitam a alteração de título, inclusão de Instituição parceira e colaborador. A alteração do título para “Identificação de alterações no transcritoma associadas à progressão metastática em adenocarcinoma de reto” se refere a alteração do tipo de molécula que será observada no estudo, de forma a permitir caracterizar de forma mais abrangente as alterações moleculares responsáveis pela progressão metastática no adenocarcinoma de reto, porém será utilizado o mesmo método de análise previamente descrito. A Instituição parceira será o Hospital do Câncer de Barretos que contribuirá com a obtenção de amostras de biopsias de câncer de reto com o auxilio do Dr. Rui Manoel Reis. Essa parceria tornou-se necessária devido à falta de informações clínicas sobre os pacientes do Hospital das Clínicas o que impossibilitou a formação de um grupo de amostras suficientes para análise estatisticamente significantes. O colaborador a ser incluído é o Dr. Fábio Marchi que tem vasta experiencia na análise de dados biológicos utilizando ferramentas de bioinformáticas e auxiliará na análise do perfil molecular obtido das amostras.

Objetivo da Pesquisa:

Já relatado no Parecer 1.840.908 de 05 de dezembro de 2016 pelo CEP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já relatado no Parecer 1.840.908 de 05 de dezembro de 2016 pelo CEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já relatado no Parecer 1.840.908 de 05 de dezembro de 2016 pelo CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já relatado no Parecer 1.840.908 de 05 de dezembro de 2016 pelo CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO da emenda ao projeto de pesquisa apresentada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 03 de setembro de 2018, o documento enviado na forma de "Emenda", se encontra APROVADO, sem (com) necessidade de envio à CONEP.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1168462_E1.pdf	24/07/2018 16:33:15		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	24/07/2018 16:32:04	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	24/07/2018 16:31:32	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	oficio_justificativa.pdf	19/07/2018 15:50:58	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_de_Mestrado_Iael_jun_2018.docx	28/06/2018 10:55:50	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_Ciencia_Dr_Rui_Reis.pdf	28/06/2018 10:43:53	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_Ciencia_Dr_Fabio_Marqui.pdf	28/06/2018 10:37:44	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Mestrado_Iael.docx	06/12/2016 15:27:56	Iael Weissberg Minutentag	Aceito

Outros	carta_encaminhamento_CEP.pdf	21/11/2016 18:01:17	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	carta_CEP_TCLE.pdf	21/11/2016 17:58:34	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	carta_Hospital_Sorocaba.pdf	21/11/2016 17:57:43	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	2585_Iael_Weissberg_Minutentag.pdf	21/11/2016 17:55:35	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Mestrado_Iael_nov_2016.pdf	21/11/2016 17:54:34	Iael Weissberg Minutentag	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BOTUCATU, 10 de Setembro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de alterações no transcritoma associadas à progressão metastática em adenocarcinoma de reto.

Pesquisador: Iael Weissberg Minutentag

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 62215416.7.3001.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.066.403

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1217487.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 04/12/2018)

RESUMO:

O câncer colorretal (CCR) é uma doença heterogênea e complexa, em parte explicada pelas diferenças anatômicas. Os cânceres de cólon direito, cólon esquerdo e reto apresentam diferenças no prognóstico, progressão metastática, estratégias de tratamento e alterações moleculares. Apesar dos avanços na terapia em CCR, metade dos casos evolui com metástases. Ao contrário dos tumores de cólon, aumento na incidência de câncer de reto (CR) tem sido observada, principalmente em indivíduos mais jovens. Assim, identificação de novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos, bem como alvos terapêuticos são necessários. Neste estudo propomos identificar uma assinatura molecular relacionada com progressão metastática em CR avaliando o perfil transcricional (RNAs codificadores e não codificadores), utilizando microarrays de alta densidade; além do perfil imunológico dos tumores (através dos transcritos relacionados à

resposta imune). Serão realizadas análises de redes e de vias biológicas. Os resultados deste estudo devem contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo metastático do adenocarcinoma de reto, bem como tem potencial para revelar novos biomarcadores associados com metástase nestes tumores, possibilitando o delineamento de estratégias terapêuticas mais eficazes para os pacientes.

INTRODUÇÃO:

INTRODUÇÃO: Epidemiologia. O câncer colorretal (CCR) é um dos tumores mais comuns na população mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram 1.360.602 casos de CCR em todo o mundo em 2012 (FERLAY et al., 2015), sendo que o câncer de reto representa aproximadamente um terço dos casos (TAMAS et al., 2015). No mundo, CCR é a quarta causa principal de morte por câncer, com aproximadamente 694.000 mil mortes em 2012(FERLAY et al., 2015). A maioria das mortes acontece em países com baixo IDH onde o prognóstico da doença é ruim, sendo que a sobrevida do paciente com CCR é altamente dependente do estágio da doença, quanto mais cedo ela for detectada maior a sobrevida do paciente (VINEIS; WILD, 2014)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).Segundo dados de 2011 do National Statistics of Cancer Incidence no Reino Unido, 31% dos casos de CCR ocorre no cólon proximal, 25% no cólon distal e 34% no reto e junção retossigmóide. O câncer de cólon proximal acomete preferencialmente mulheres, enquanto que o câncer de reto tem maior incidência em homens (TAMAS et al., 2015). A incidência mundial do câncer de reto é de 13/100.000 por ano, porém com variações significativas entre diferentes países. Dados de 1998-2002 mostraram uma incidência de 2/100.000 na Índia até 31,6/100.000 no Canadá. Na Europa, as taxas mais baixas são na Islândia (7,6/100.000) e as mais altas na República Tcheca e Eslováquia (27 e 24/1000.000, respetivamente)(ABREU et al., 2011).Dados estatísticos de 2015 de câncer nos EUA revelam uma diminuição na incidência de CCR, com uma queda anual em torno de 4% de 2008 a 2011. Esta queda é atribuída principalmente ao aumento de quase três vezes na porcentagem de indivíduos com idade entre 50 -75 anos submetidos à colonoscopia; o que favorece o diagnóstico precoce e retirada de lesões prémalignas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Por outro lado, outro estudo com pacientes dos EUA mostrou aumento da incidência de CCR em indivíduos jovens (35-49 anos), particularmente de câncer de reto. Neste mesmo estudo, modelos estatísticos de predição indicam para o ano de 2030 um aumento de câncer de reto de 124,2% em pacientes com

idade entre 20-34 anos e de 46% para pacientes com 35-49 anos. Para o câncer de cólon foi estimado aumento de 90% e 27,7% em pacientes destas mesmas faixas etárias (BAILEY et al., 2015). Esse aumento da incidência de CCR em pacientes jovens, em particular do câncer de reto, tem sido também observado em outros países, embora a causa para este aumento ainda é desconhecida (DEEN et al., 2016).Fatores de risco associados ao CCR Dentre os casos de CCR estima-se que cerca de 30% possam ter componentes hereditários ou familiares (DEEN et al., 2016). Destes, apenas 5% são CCR hereditários e que podem ser subdivididos em síndromes polipoides, caracterizadas pela presença de múltiplos pólipos intestinais, ou em síndromes não polipoides(VASEN; TOMLINSON; CASTELLS, 2015). A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) está associada com o desenvolvimento de vários adenomas e, subsequentemente, com o aparecimento de carcinomas colorretais, sistema nervoso central (SNC), fígado, ducto biliar e tireoide. A FAP tem herança autossômica dominante e é caracterizada por uma mutação germinativa no gene APC. Uma variante dessa síndrome está relacionada a uma mutação no gene MUTYH, denominada Polipose Associada à MUTYH (MAP)(HALF; BERCOVICH; ROZEN, 2009).A Síndrome de Lynch é a causa mais comum de CCR hereditário e é caracterizada pelo desenvolvimento de CCR em idade jovem (síndrome de Lynch tendem a desenvolver carcinomas mucinosos, pouco ou não diferenciados ou carcinomas medulares ainda jovens(FLEMING et al., 2012). Esta síndrome é caracterizada pela instabilidade de microssatélites (microsatellite instability- MSI) decorrente de mutações em genes de reparo a danos no DNA, principalmente os genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (LYNCH et al., 2015). Quase 90% dos pacientes com a síndrome de Lynch apresentam mutações nos genes MLH1 ou MSH2 (FLEMING et al., 2012). Porém, epimutações no gene MSH2 resultantes de deleções germinativas no gene EPCAM são também relatadas (NIESSEN et al., 2009). A frequência das mutações e os tumores extra-colônicos associados parecem variar em diferentes populações (LYNCH et al., 2015).A síndrome de Peutz-Jeghers, também autossômica dominante com mutações no gene STK11 (LKB1), é caracterizada clinicamente pela presença de pólipos no intestino delgado formados de epitélio, estroma e musculo liso; pigmentação mucocutânea e predisposição ao desenvolvimento de diferentes tumores. A mortalidade em pacientes com a síndrome não está associada com a Polipose, mas ao desenvolvimento de vários tumores como CCR, seguido de câncer de mama, intestino delgado, tumores gástricos e pancreáticos (SHORNING; CLARKE, 2016) (FLEMING et al., 2012). Quanto aos CCR esporádicos, os fatores de risco associados compreendem idade, estilo de vida e fatores genéticos. A idade avançada está associada com maior risco de desenvolvimento de CCR, bem como o consumo de carnes vermelhas e processadas, baixa ingestão de frutas e verduras, sedentarismo e tabagismo. Por outro lado, a

ingestão de cálcio e vitamina D, aliados a uma dieta saudável e atividade física foram identificados como fatores de proteção contra o câncer colorretal, além de aumentar a sobrevida dos pacientes com CCR (LEE; KEUM; GIOVANNUCCI, 2016) (FIGUEIREDO et al., 2014). Adicionalmente, fatores de risco como sedentarismo, obesidade e tabagismo parecem estar mais associados com câncer de cólon do que câncer de reto (TAMAS et al., 2015). Se por um lado, o fator genético está fortemente associado a 30% dos CCR com história familial ou síndromes genéticas hereditárias, o risco genético associado aos 70% restante dos casos de CCR pode ser resultado de variantes genéticas comuns de baixa penetrância (ZHANG et al., 2014). Estudos de associação de genoma global (genome-wide association study, GWAS) têm identificado polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorhism, SNP) que podem influenciar o risco de desenvolvimento de CCR. A abordagem de GWAS já identificou inúmeros SNPs de risco distribuídos em mais de 40 regiões cromossômicas envolvendo a maioria dos cromossomos humanos. A maioria destas variantes apresenta um efeito pequeno, em geral apresentando OR (odds ratio) de 1,2 ou menor. A maioria das variantes de risco identificada nestes estudos está mapeada próxima de genes envolvidos em vias moleculares já associadas com câncer, como controle do ciclo celular, sinalização celular, regulação da expressão gênica, entre outras(revisado em ZHANG et al., 2014). Alguns modelos empregando essas variantes de risco têm sido propostos para prever com mais precisão o risco de câncer colorretal em pacientes com histórico familial de CCR. O modelo proposto por Hsu et. al, 2015 analisou 27 diferentes SNPs já correlacionados com a susceptibilidade ao CCR, juntamente com os dados de histórico familiar, idade, sexo e histórico de endoscopias obtidos de seis estudos epidemiológicos. O modelo de risco proposto, que incorpora um escore de risco genético e a história familial, aumentou a acurácia na identificação de casos de CRC. Os autores propõem que este modelo pode ser usado como uma ferramenta mais refinada e eficiente de discriminar os pacientes que devem ser encaminhados para um acompanhamento mais rigoroso do que os modelos baseados exclusivamente no histórico familiar(HSU et al., 2015).Estudos mais recentes têm abordado a combinação dos fatores de risco associados com dieta e essas variantes genéticas, como modificadores de risco ao CCR. No estudo de Figueiredo et al (2014) foi investigada a associação de 2,7 milhões de SNPs comuns e sua interação com a dieta (ingestão de carne vermelha, alimentos processados, frutas, vegetais e fibras) como modificadores de risco para o desenvolvimento do CCR num estudo de caso-controle envolvendo 9.287 pacientes com CCR e 9.120 controles. Foi observada uma associação entre o SNP rs4143094 mapeado em 10p14 e o consumo de carne processada com aumento de risco ao desenvolvimento de CCR. Essa variante está localizada a jusante do gene GATA3, sendo que o aumento de expressão deste gene já foi

associado com colites ulcerativas e aumento de risco ao desenvolvimento de CCR. Os autores postulam que a ingestão de carne processada levaria a uma resposta inflamatória prótumorigênica que ativaria a transcrição do gene GATA3 particularmente nos indivíduos com esta variante, aumentando assim o risco de desenvolvimento de CCR (FIGUEIREDO et al., 2014).Histopatologia e aspectos clínicos dos CCRMais que 90% dos casos de CCR são classificados como adenocarcinomas (World Cancer Research Fund International, 2012). Os adenocarcinomas são originados de células epiteliais da mucosa colorretal (FLEMING et al., 2012). Outros tipos de câncer mais raros são os de células neuroendócrinas, de células escamosas, de células escamosas e glandulares, de fuso celular e carcinomas não diferenciados.(NAGTEGAAL; HUGEN, 2015). Na classificação utilizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) há ainda algumas variações histológicas nos CCR, sendo os principais o carcinoma do tipo intestinal ou convencional; o carcinoma mucinoso, onde mais do que 50% do volume tumor é composto por muco extracelular, e o carcinoma de células de anel de sinete (NAGTEGAAL; HUGEN, 2015). Este último representa menos que 1% dos casos de CCR e é caracterizado por apresentar mais que 50% das células no formato de anel de sinete, devido ao grande vacúolo de mucina intracelular que desloca o núcleo para a periferia das células.(FLEMING et al., 2012). Um subtipo extremamente raro é carcinoma medular (aprox. 0,08% dos casos), caracterizado pela presença de camadas de célula epiteliais neoplásicas com grandes vacúolos nucleares, nucléolos proeminentes e citoplasma abundante, além de grande infiltração de leucócitos. Esse subtipo costuma ter um bom prognóstico apesar de serem pouco diferenciados. Além dessas variantes histológicas, há ainda os carcinomas micropapilares, serrado, indiferenciados, entre outros (FLEMING et al., 2012). Alguns subtipos histológicos tumores parecem ser mais frequentes em determinados regiões do trato intestinal. Por exemplo, a ocorrência de tumores mucinosos e de células de anel de sinete é maior no cólon proximal do que no cólon distal e reto (TAMAS et al., 2015).Nas últimas duas décadas os avanços no tratamento dos pacientes com CCR levaram a um aumento na sobrevida dos pacientes, incluindo pacientes metastáticos. No entanto, apesar desses avanços, cerca de 50% dos pacientes ainda morre pela doença. Além disso, cerca de 20% dos pacientes apresentam doença metastática ao diagnóstico (RIIHIMÄKI et al., 2016). Os sítios metastáticos mais comuns dos CCR são o fígado, pulmões, ossos, cérebro, entre outros. Há vários estudos na literatura mostrando diferenças quanto aos padrões de disseminação metastática entre tumores de cólon e reto (revisado em TAMAS et al., 2015). Riihimäki et al. (2016) conduziram um estudo na Suécia para identificar os padrões de metástase em 49.096 pacientes com CCR. Os resultados mostraram que comparado ao câncer de cólon, o câncer de reto apresenta mais frequentemente metástases torácicas, seguido de

osso e sistema nervoso central (SNC) e menos frequentemente no peritônio. Por outro lado, as mulheres com câncer de cólon ou câncer de reto mostraram metástase preferencialmente no fígado. Análise de sobrevida em pacientes com metástases em um único sítio mostrou que a mediana de sobrevida foi de 9 meses para pacientes com metástase em fígado, 14 meses para metástase torácica, 4 meses para metástases em SNC e 5,5 meses para metástases ósseas. O estadiamento baseado no TNM (tamanho do tumor, status linfonodal e metástase) se mostrou fortemente associado com a sobrevida, sendo que maior sobrevida foi observada para pacientes com tumores T2 vs T4 (16,5 meses vs 8 meses) e N0 vs N2 (19 vs 8 meses) (RIIHIMÄKI et al., 2016). Estes dados reforçam o conhecimento atual de que os tumores de cólon e de reto são entidades diferentes, apresentando evoluções clínicas distintas.Os tumores de colón apresentam preferencialmente metástases no fígado devido à drenagem venosa do intestino grosso pelo sistema porta-hepático. Por outro lado, tumores da porção distal do reto tendem a apresentar metástases no pulmão, pois a drenagem venosa na região distal é feita pela veia inferior do reto que se liga diretamente na veia cava inferior. (ABREU et al., 2011). Um estudo anterior já havia mostrado essa diferença no padrão metastático de acordo com o sítio do tumor, cólon ou reto (HUGEN et al., 2014). Este estudo que incluiu dados de autópsia de 1675 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. Adicionalmente, os autores mostraram padrões metastáticos distintos de acordo com o subtipo histológico. Os adenocarcinomas de reto, que representavam em torno de 86% dos casos, comparados aos carcinomas mucinosos de reto mostraram disseminação metastática preferencialmente para fígado. Enquanto metástase em pulmão, linfonodos distantes e outros sítios (principalmente cérebro) não mostraram diferenças significativas entre os subtipos tumorais do câncer de reto (HUGEN et al., 2014).Nos últimos anos, avanços no tratamento e evolução clínica dos CCR em estádios iniciais e avançados têm sido observados. Sucesso no tratamento tem sido observado mesmo para alguns pacientes com doença metastática limitada ao fígado ou pulmão e tratados com múltiplas terapias. Mesmo tumores metastáticos não ressecáveis podem ser submetidos a tratamento sistêmico com objetivo de tornar os tumores não ressecáveis em ressecáveis, chamado de terapia de conversão. Segundo a última recomendação da European Society for Medical Oncology (ESMO) para CCR metastáticos, qualquer paciente com metástase de fígado ou pulmão pode ser um candidato em potencial para terapia de conversão, uma vez que não existem critérios bem estabelecidos para distinguir os pacientes que devem ser tratados paliativamente daqueles com potencial tratamento curativo (VAN CUTSEM et al., 2016). A

ressecção cirúrgica é ainda considerada a base para a terapia curativa do CCR. O tipo de ressecção cirúrgica depende da localização do tumor, tamanho, estadiamento, e ainda das escolhas do paciente. O estadiamento e tratamento do câncer de cólon e câncer de reto apresentam diferenças importantes. Quimioterapia adjuvante é indicada para tumores de cólon de estadio III, enquanto sua utilização em pacientes com estadio II ainda é controverso (revisado em OBUCH; AHNEN, 2016). O tratamento local do câncer de reto é mais agressivo do que o tratamento do cólon, principalmente devido à proximidade do reto a vários órgãos e estruturas vitais, como grandes vasos, bexiga, órgãos genitais entre outros. A estratégia de tratamento do câncer de reto é baseada no tamanho do tumor (T), status nodal (N) e margem de ressecção circunferencial cirúrgica obtidos nos exames de ultrassom endorretal e ressonância magnética nuclear (RMN) (revisado em TAMAS et al., 2015). Além disso, invasão vascular extramural detectada por RMN está associada com pior prognóstico, principalmente com desenvolvimento de metástase à distância (GLIMELIUS et al., 2013). 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 (total mesorectal excision –TME) é o tratamento padrão, porém apresenta uma taxa de recorrência local de 10% em cinco anos (TAMAS et al., 2015)Dos avanços no tratamento dos CCR, observa-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 CCRO câncer é uma doença genética causada por mutações no DNA e alterações epigenéticas que culminam na proliferação descontrolada. 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).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).O modelo de progressão do carcinoma colorretal foi proposto por Volgestein e colaboradores em 1988, que postula que esta neoplasia é o resultado da progressão de adenoma para carcinoma decorrente do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que levam a instabilidade cromossômica e desequilíbrio de funções celulares

importantes que favorecem a carcinogênese. Neste modelo foi descrito que mutações no oncogene gene KRAS e perda de heterozigose (LOH- do inglês Loss of Heterozygosity) no locus do gene supressor tumoral APC ocorrem incialmente 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: 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)A instabilidade cromossômica (CIN) é caracterizada principalmente por aneuploidia e LOH, e é observada principalmente nos CCR derivados de adenomas presentes no intestino grosso, independentemente do sítio anatômico. CIN é observada em cerca de 70% dos CCR esporádicos, é caracterizada por apresentar ganhos e perdas de grandes regiões cromossômicas ou até de cromossomos inteiros; levando a aneuplodias e perdas de heterozigoses (LOH) e consequentemente a defeitos na segregação das cromátides, instabilidade dos telômeros e dano ao DNA. Sua causa exata ainda não é conhecida, porém mutações nos oncogenes 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. Nos tumores esporádicos é resultante principalmente de hipermetilação do promotor do gene MLH1, levando ao silenciamento deste gene. Este subgrupo de tumores com MSI representa cerca de 15% dos tumores colorretais. Esta alteração é rara nos tumores de reto, porém é frequente em adenocarcinoma mucinoso ou em anel de sinete e tumores pouco diferenciados localizados no cólon proximal, e é frequentemente associada com mutação ativadora no oncogene BRAF. 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. Tumores com estas alterações se mostram resistentes ao tratamento com inibidores de EGFR. Além disso, apresentam infiltrado linfocítico 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 de CpG (CIMP) são caracterizados pelo excesso de ilhas CpGs 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, que mostram frequentemente hipermetilação do gene MLH1, ou em 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 The Cancer Genome Atlas Network (TCGA) que mostrou a caracterização molecular de um grupo grande de amostras de CCR (N=276) integrando dados genômicos, transcriptômicos e epigenômico. A análise genômica, resultante da comparação de 224 CCR e tecidos adjacentes normais 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 apresentaram menor frequência de mutação nos tumores hipermutados (60 versus 20% para APC e 81% versus 51% para TP53, respectivamente). Cerca de 75% dos tumores hipermutados apresentaram também alta MSI, com hipermetilação e silenciamento do gene MLH1; e 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 originários do cólon proximal (TCGA, 2012). Esses dados sugerem que os tumores não -hipermutados correspondem ao subgrupo CIN, e os tumores hipermutados ao subgrupo MSI.Em 2015 um consórcio internacional dedicado à análise de dados moleculares em larga escala reportou um consenso sobre os subtipos moleculares do câncer colorretal (GUINNEY et al., 2015). Este consórcio compilou os dados de dezoito estudos, incluindo os dados do TCGA, incluindo assim um número muito grande de amostras (N=4.151). Quatro subtipos moleculares foram identificados: CMS1 (consensus molecular subtype 1), CMS2, CMS3 e CMS4. O subgrupo CMS1 (MSI imune), que compreendia 14% dos tumores, tinha como características predominantes a instabilidade de microssatélites (MSI), baixo prevalência de alterações no número de cópias

genômicas (CNAs), hipermutação, e perfil transcricional associado a forte ativação da resposta imune. O subtipo CMS2 (Canônico) foi identificado em 37% dos tumores e apresentava um perfil transcricional associado a diferenciação epitelial, instabilidade cromossômica (CIN) e ativação das vias de sinalização de WNT e MYC. Ganhos ou amplificações em oncogenes e perdas cromossômicas em genes supressores tumorais foram também observadas neste subtipo molecular. O subtipo CMS3 (metabólico) incluiu 13% dos casos e apresentava um perfil transcricional semelhante ao subtipo metabólico descrito em câncer gástrico. Por último, o subtipo CMS4 (mesenquimal), compreendendo 23% dos tumores, apresentou aumento de expressão de genes associados a transição epitélio-mesênquima (TEM) e uma assinatura de ativação da via de sinalização do TGF-, bem como de angiogênese, de remodelamento de matriz extracelular e infiltração estromal. Interessantemente, 13% dos casos apresentaram aspectos mistos, que os autores atribuíram a um provável fenótipo de transição ou heterogeneidade intratumoral (GUINNEY et al., 2015). 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. Além disso, outros mecanismos de regulação gênica, como os microRNAs, ainda precisam ser melhor explorados neste contexto.Bases biológicas e moleculares da disseminação metastática do CCRAs metástases se desenvolvem a partir de uma série de eventos conhecidos como cascata de invasão e metástase, e envolve um complexo processo evolucionário, 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 fina de sinais oncogênicos associados com a disseminação do tumor (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016; PATEL; VANHARANTA, 2016)Dentre as alterações epigenéticas, os RNAs não codificadores (ncRNAs) têm papel relevante por atuarem em vários processos tumorais (BARTONICEK; MAAG; DINGER, 2016; LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014). Os ncRNAs são classificados em small ncRNAs (sncRNAs), com menos que 200 nucleotídeos (nt), e long ncRNAs (lncRNAs), com mais de 200nt (WANG et al., 2015).Os lncRNAs têm ganhado especial atenção nos últimos anos pela sua importância na regulação póstranscricional, envolvendo o controle da síntese de proteínas, maturação do RNA, transporte do RNA e silenciamento gênico por meio de alterações na cromatina. Adicionalmente, os lncRNAs podem atuar como precursores de miRNAs ou como “esponjas” de miRNAs, inibindo suas funções, além de servirem como estrutura para ancoragem de complexos proteicos que regulam a cromatina. Diferentes células e

tecidos apresentam baixa expressão de lncRNAs, sendo que frequentemente se apresentam com expressão aumentada em diferentes tumores (BARTONICEK; MAAG; DINGER, 2016; ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2016). Como exemplo, HOX transcript antisense RNA (HOTAIR), um lncRNA oncogênico, já foi descrito com expressão aumentada em uma variedade de cânceres humanos, incluindo CCR (ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2016), sendo que níveis aumentados de HOTAIR também foram associados com pior prognóstico em CCR (KOGO et al., 2011). Similarmente, o aumento de expressão de MALAT1 (Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) foi associado com progressão metastática em CCR (ZHENG et al., 2014)Por outro lado, o lncRNA H19 pode agir como supressor tumoral e oncogene em modelo in vitro e in vivo de progressão tumoral do câncer de cólon, apresentando expressão diminuída no início do processo metastático e aumento de expressão nos estadios mais tardios, como durante a colonização em órgãos à distancia (ROKAVEC; HORST; HERMEKING, 2017). Um metanálise avaliou lncRNAs como marcadores prognósticos em CCR e identificou aumento de expressão de SPRY4-IT1, FEZF1-AS1, 91H, PCAT-1, H19, CCAT1, UCA1, HOTAIR, SNHG20, NEAT1, DANCR, CRNDE-h, PANDAR, HOTTIP,TUG1, ANRIL, PVT-1, AFAP1-AS1, ZFAS1 e CLMAT3 nos tumores (WANG et al., 2015). O aumento de HOTAIR e UCA1 foi associado com diminuição de sobrevida global. Porém, a maioria dos estudos incluídos na metanálise avaliou pacientes chineses, por isso, outros estudos incluindo pacientes de diferentes populações são necessários para identificar potenciais biomarcadores em CCR.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, e do miR-21 e miR-203 em amostras de 50 CCR e 20 tecidos adjacentes não neoplásicos. Níveis aumentados de expressão do miR-21 e miR-203 foram identificados nos tumores, porém sem diferença para EGFR e KRAS. (CARVALHO et al., 2017) Almeida et. al. (2016) identificaram menores níveis de miR-21, miR-34 e miR-126 no plasma de 37 pacientes com CCR comparados a indivíduos saudáveis.(ALMEIDA et al., 2016)Estudo conduzido pela Dra Silvia R Rogatto, busca identificar marcadores de resposta à terapia neoadjuvante em CR utilizando análises globais de alterações no número de cópias genômicas e de expressão gênica e de metilação nos tumores com resposta completa comparados com resposta incompleta. Resultados preliminares indicam que genes de resposta imune estão associados com a resposta completa a terapia nestes pacientes (comunicação pessoal).

HIPÓTESE:
O adenocarcinoma de reto apresenta uma assinatura de alterações transcritomicas única associada com a progressão metastática que pode ser utilizada para auxiliar estratificação de risco de pacientes com a doença.

Objetivo da Pesquisa:
OBJETIVO PRIMÁRIO:
Avaliar alterações moleculares no transcritoma amostras de adenocarcinoma de reto para identificar uma assinatura molecular e imunológica associada com progressão e metástase.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:
1. Identificar o perfil global de expressão de transcritos (codificadores e lncRNAs);
2. Classificar molecularmente os tumores a partir dados do transcritoma identificado os subtipos CMS por meio de ferramentas de bioinformática.
3. Identificar redes de regulação envolvendo lncRNAs-mRNAs associadas com a progressão metastática no CR.
4. Avaliar o perfil imunológico de CR associado com a progressão metastática por meio da identificação das células imunes infiltrantes nos tumores por análise do transcritoma, selecionando genes de resposta imune e pela utilização de algoritmos que estimam a quantidade de células imunes infiltrantes do tumor.
5. Identificar genes candidatos e vias alteradas associados com a progressão metastática.
6. Validar os candidatos por IHQ e/ou Nanostring no mesmo grupo de amostras e em amostras independentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
RISCOS:
Não há riscos inerentes a pesquisa aos voluntários do estudo ou aos pesquisadores.

BENEFÍCIOS:
Esse estudo não trará benefícios imediatos aos participantes da pesquisa, porém os dados que serão obtidos permitirão uma melhor caracterização da assinatura de transcritos alterados do adenocarcinoma de reto, que poderá futuramente ser usada na estratificação de risco de pacientes

e possibilitando o delineamento de estratégias terapêuticas mais eficazes para os pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

RESPOSTAS REFERENTES AS PENDÊNCIAS EMITIDAS NO PARECER N°3.049.560:

1. Não há uma coerência em relação ao tamanho amostral: Mabin afirma que serão utilizadas 100 amostras de tecido tumoral congelado; documento de cadastro do projeto afirma que serão 50 amostras de Barretos e 60 totais no estudo; Ainda, o PB_Informações básicas informa que serão 30 indivíduos no grupo treinamento e 30 no grupo validação e, no item "Outras informações", também parte do documento PB_Informações básicas, informa que serão amostras de parafina (e não tecido congelado conforme consta no Mabin), sendo 50 retrospectivas e 10 coletadas prospectivamente. Dessa maneira, solicita-se um esclarecimento e uma uniformidade nos diferentes documentos sobre o tipo de amostra a ser utilizada (se parafinada ou congelada), se será coleta prospectiva ou retrospectiva e qual será exatamente o tamanho amostral de participantes do HCB. Caso a amostra seja parafinada, deve-se incluir ciência da Patologia e documentos associados à essa utilização. No caso de amostras do biobanco, segue a mesma regra.
- RESPOSTA PESQUISADOR: O HCB participará com 50 amostras de tecido congelado. O dado foi ajustado no Mabin como solicitado. As demais amostras (tecido parafinado, amostras coletas prospectivamente, etc) serão obtidas das outras instituições participantes do estudo.
- ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Não fica clara qual será a participação efetiva do HCB nesse estudo. Solicita-se esclarecimento acerca dessa participação.
- RESPOSTA PESQUISADOR: O Hospital de Câncer de Barretos participará do estudo tendo um de seus pesquisadores na equipe de pesquisa. E também contribuirá com 50 amostras de tecido congelado de pacientes com câncer de colorretal.
- ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Dado que os pacientes do HCB serão incluídos a partir de material armazenado no Biobanco Institucional, solicita-se apresentar relatório do status do TCLE-Biobanco para a casuística que será incluída no estudo
- RESPOSTA PESQUISADOR: Anexamos o relatório fornecido pelo biobanco institucional com a disponibilidade de 73 amostras com Termo de consentimento Livre e esclarecido.

- ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Em relação aos riscos do estudo, os pesquisadores afirmam não haver risco e não mencionam o risco de quebra acidental de sigilo das informações dos participantes ou de seus dados genéticos. Solicita-se adequar esse campo, informando todos os possíveis riscos, incluindo possível quebra de sigilo.
- RESPOSTA PESQUISADOR: Foi incluído no projeto o item “Aspectos éticos”, abordando os riscos e a conduta dos pesquisadores para minimiza-los.
- ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Todos os termos foram adequadamente apresentados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:
O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Amor de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1 Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 07/06/2019.
2 Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3 Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4 Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5 Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

6 Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1687/2018.

OBSERVAÇÃO: Devido a Lei da Biodiversidade (Lei 13.123/15) tornou-se obrigatório o cadastro de todas as pesquisas que de alguma forma tiveram acesso ao patrimônio genético brasileiro e/ou conhecimento tradicional associado, na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen (https://sisgen.gov.br/paginas/login.aspx).
Quais atividades deverão ser cadastradas?
I - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado dentro do país realizado por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;
II - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado por pessoa jurídica sediada no exterior associada a instituição nacional de pesquisa científica e tecnológica, pública ou privada;
III - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado realizado no exterior por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;
IV - remessa de amostra de patrimônio genético brasileiro para o exterior com a finalidade de acesso, nas hipóteses II e III;
V - envio de amostra que contenha patrimônio genético brasileiro por pessoa jurídica nacional, pública ou privada, para prestação de serviços no exterior como parte de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1217487.pdf	04/12/2018 01:30:05		Aceito
Outros	TCLE_BIOBANCO_hcb.pdf	04/12/2018 01:27:50	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	MABIN_PENDENCIA2.pdf	03/12/2018 18:28:54	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	carta_pendencia.pdf	03/12/2018 18:26:32	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	Carta_Pendencias.docx	03/12/2018 18:26:04	Iael Weissberg Minutentag	Aceito

Outros	Projeto_de_Iael_Projeto_Resp_Pendecia.docx	03/12/2018 17:42:07	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	cadastro_nap_hcb.pdf	08/10/2018 17:39:46	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Mabin_hcb.pdf	25/09/2018 11:08:07	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	Formulario_de_requisicao_de_material_biologico.docx	25/09/2018 11:07:32	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_viabilidade_hcb.pdf	25/09/2018 11:06:01	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_responsabilidade_pesquisador_hcb.pdf	25/09/2018 10:59:11	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Relatorio_biobanco_hcb.pdf	25/09/2018 10:58:58	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	oficio_justificativa.pdf	19/07/2018 15:50:58	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_de_Mestrado_Iael_jun_2018.docx	28/06/2018 10:55:50	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Mestrado_Iael.docx	06/12/2016 15:27:56	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	carta_encaminhamento_CEP.pdf	21/11/2016 18:01:17	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	carta_CEP_TCLE.pdf	21/11/2016 17:58:34	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Outros	carta_Hospital_Sorocaba.pdf	21/11/2016 17:57:43	Iael Weissberg Minutentag	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Mestrado_Iael_nov_2016.pdf	21/11/2016 17:54:34	Iael Weissberg Minutentag	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BARRETOS, 07 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Pedro Rafael Martins De Marchi
(Coordenador(a))

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