



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CAMILA MEIRELLES DE SOUZA SILVA

**ASSINATURA DE microRNAs CIRCULANTES (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p,
hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) COMO PROMISSORES BIOMARCADORES
PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE CÂNCER COLORRETAL**

FORTALEZA
2019

CAMILA MEIRELLES DE SOUZA SILVA

**ASSINATURA DE microRNAs CIRCULANTES (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p,
hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) COMO PROMISSORES BIOMARCADORES
PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr Roberto César Pereira
Lima Júnior

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579a Silva, Camila Meirelles de Souza.

Assinatura de microRNAs circulantes (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) como promissores biomarcadores para o diagnóstico precoce de câncer colorretal / Camila Meirelles de Souza Silva. – 2019.

95 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

1. Biomarcador. 2. miRNA. 3. câncer colorretal. I. Título.

CDD 615.1

CAMILA MEIRELLES DE SOUZA SILVA

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr Roberto César Pereira Lima Júnior

Aprovado em: 26/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Helano Carioca Freitas
Hospital A.C. Camargo Cancer Center

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Duilio Reis da Rocha Filho
Hospital Universitário Walter Cantídio

Prof^a. Dr^a. Sintia Silva de Almeida
Universidade Federal do Ceará

**Dedico esse trabalho ao Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*)
e a todos os pacientes que participaram desse estudo, todos compartilhando a
esperança de dias melhores, e acreditando que isso possa acontecer a partir
da ciência.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ronaldo Ribeiro pela oportunidade, confiança, orientação e amizade. Em sua apresentação do memorial ele falou que trazia no seu matulão: expectativas, esperança, e uma vontade muito, muito grande de fazer as coisas funcionarem. Essa é uma das grandes lições que tenho comigo, dentre tantas outras.

Ao professor Roberto César, por ter me orientado e pela confiança em mim para continuar com esse projeto.

Ao Dr. Marcellus Souza, Dr^a Rosane Sant'Ana, Dr. Daniel Ferreira, Dr^a Maria Perpétuo Saldanha e Dr. Carlos Hirth pela colaboração que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

A Dr^a Josiane Quetz pela escrita do projeto e submissão aos órgãos de fomento, a Lívia Nobre, Armando, Carlos Wagner, Larisse Lucetti, Heitor e Camila Fernandes pela colaboração no recrutamento dos pacientes e processamento inicial das amostras e a Dr^a Deysi Wong pela colaboração na tomada de decisões para compra de todo o material utilizado e no processamento das amostras na fase de coorte de descoberta. Sem essa equipe não teríamos conseguido fazer todo o trabalho em tão pouco tempo. Em especial a Lívia Nobre que se dedicou inteiramente a esse estudo e esteve ao meu lado durante toda a caminhada. Lívia, obrigada por todos os momentos, você é luz! Confia e segue!

A prof^a. Dr^a Silvia Rogatto, Dr^a Hellen Kuasne, Julia Homem e Mateus Camargo pela colaboração na coorte de descoberta e validação e na análise de todos os dados.

A Dr^a Paula Barbin e a Mariana Pereira pela colaboração nas análises de predição *in silico* e ao Paulo Goberlânio pelas análises bioestatísticas.

As técnicas Vandinha e Adenilde pela grande ajuda. Em especial a Adenilde minha mãe, ter a minha mãe me ajudando nessa fase foi muito valioso.

Aos amigos do laboratório Lívia Nobre, Anielle, Livia Talita, Lethícia, Venúcia, Wanderlei, Ana Paula, Lucas Carvalho, Lucas Nicolau, Camila Fernandes, Diego Quixadá, Renata e Diego Bernande pela amizade e os inúmeros momentos de alegria e descontração, sinto muita falta. Em especial a Anielle que compartilhou de muitos momentos de alegria e tristeza durante toda essa caminhada. Você é incrível!

Aos amigos que o professor Ronaldo me deu o prazer de conhecer, a tão falada "Turma do balacobaco". Muito feliz pelo carinho de vocês.

A família do professor Ronaldo que sempre me recebeu com tanto amor e carinho, em especial a matriarca tão forte e de um coração tão generoso, a Dona Railda.

Ao prof. Dr. Fernando Cunha, pela acolhida e confiança contribuindo para o meu amadurecimento científico e pessoal.

A Clarissa Sampaio por ser essa pessoa tão especial. Uma amiga que me acolheu como alguém da família. Me espelho em você, uma mulher forte, determinada,

inteligente e linda por dentro e por fora. Obrigada por todos os momentos compartilhados, na alegria e na tristeza.

Em especial ao Carlos Wagner pelo companheirismo, amizade, amor e cuidado, nossa sintonia é algo raro. Além do auxílio científico diário, você é o meu grande exemplo.

Ao REBRATS-SUS pelo financiamento da pesquisa e aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FUNCAP.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas a este trabalho.

A vida sem ciência é uma espécie de morte.

Sócrates

RESUMO

O câncer colorretal é uma doença com alta incidência e mortalidade e representa um dos grandes desafios para a saúde pública. O alto índice de mortalidade está, em parte, relacionado ao diagnóstico da doença em estágio avançado. Esse fato tem instigado a busca por ferramentas mais efetivas para detecção precoce de câncer colorretal, pouco invasivas e que possam ser realizadas em larga-escala. Sob essa perspectiva, a análise da expressão sérica de microRNAs (miRNAs) apresenta-se como uma alternativa, uma vez que, são altamente estáveis no sangue e estão frequentemente alterados em diversas patologias, especialmente no câncer. Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs que atuam como reguladores pós-transcricionais afetando vários processos fisiopatológicos inclusive as fases de desenvolvimento do câncer colorretal. Nesse contexto, o presente estudo foi conduzido a fim de identificar um perfil de expressão diferencial de miRNAs circulantes como possível método pouco invasivo para diagnóstico precoce de câncer colorretal. Para alcançar esse objetivo utilizamos a metodologia de análise em larga escala para identificar o perfil de expressão de miRNAs plasmáticos em indivíduos divididos criteriosamente em grupo não-câncer (voluntários saudáveis, pacientes com pólipos hiperplásicos e adenomas) vs. grupo câncer (pacientes com câncer colorretal inicial e câncer colorretal com metástase). Posteriormente, os miRNAs diferencialmente expressos foram validados por qRT-PCR. O poder discriminante dos miRNAs entre os grupos foi avaliado por curva ROC e modelo multivariado, e a predição de alvos e possíveis vias de sinalização envolvidas foram analisadas usando predição *in silico* através de ferramentas de bioinformática. Foram identificados quatro miRNAs (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) superexpressos no grupo câncer quando comparado ao grupo não câncer, sendo o hsa-miR-28-3p o melhor marcador diagnóstico encontrado (ROC 0,7841 [0,6890 - 0,8793]), seguido do hsa-miR-542-5p (ROC 0,7174 [0,6167 - 0,8181]). A associação entre dois miRNAs também apresentou alto poder discriminante entre os grupos câncer vs. não-câncer com as seguintes associações: hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p (ROC 0,7363 [0,6670 - 0,8056]); hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106a-5p (0,7324 [0,6597 - 0,8051]) e (hsa-miR-28-3p e hsa-let-7e-5p (ROC 0,7264 [0,6555 - 0,7974])); e associação de três e quatro miRNAs: hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-28-3p (ROC 0,7102 [0,6506 - 0,7697]) e hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p (ROC 0,7053 [0,6543 - 0,7564]). Além disso, a previsão de alvos e vias de sinalização *in silico* mostrou que os miRNAs hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, e hsa-miR-28-3p regulam genes enriquecidos em vias associadas ao câncer. Dessa forma, no presente estudo foi demonstrado que a avaliação da expressão sérica do hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p poderia ser utilizada como uma assinatura de miRNAs para o diagnóstico precoce, pouco invasivo de câncer colorretal.

Palavras-chave: Biomarcador, miRNA, câncer colorretal.

SIGNATURE OF CIRCULATING microRNAs (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) AS PROMISING BIOMARKERS FOR EARLY DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

ABSTRACT

Colorectal cancer is a disease with high incidence and mortality and represents one of the great challenges for public health. Its high mortality rate is, in part, related to the diagnosis of advanced disease. This has encouraged the search for new tools for early detection of colorectal cancer that are more effective, less invasive and that can be performed on a large scale. Under this perspective, the analysis of the serum expression of MicroRNAs (miRNAs) is presented as an alternative, since they are highly stable in the blood and are frequently altered in several pathologies, especially in cancer. The miRNAs are a class of small RNAs that act as transcriptional regulators affecting several pathophysiological processes including the developmental stages of colorectal cancer. In this context, the present study was conducted to identify a differential expression profile of circulating miRNAs as a possible noninvasive method for early diagnosis of colorectal cancer. For this, we used the methodology of large scale analysis to identify the expression profile of plasma miRNAs in subjects carefully divided into non-cancerous group (healthy volunteers, patients with hyperplastic polyp and adenoma) vs. cancer group (colorectal cancer and colorectal cancer with metastasis). Subsequently the differentially expressed miRNAs were validated by qRT-PCR. The discriminant power of the miRNAs between the groups was evaluated by ROC curve and multivariate model and the prediction of targets and pathways involved was analyzed using the bioinformatics tools. Were identified four miRNAs (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p and hsa-miR-542-5p) overexpressed in the cancer group when compared to non-cancer group, being the hsa-miR-28-3p the strongest diagnostic marker (ROC 0.7841 [0.6890-0.8873]) followed by hsa-miR-542-5p (ROC 0.7174 [0.6167-0.8181]). Association between two miRNAs also showed high discriminant power between groups cancer vs. non-cancer with the following associations: hsa-miR-28-3p and hsa-miR-542-5p (ROC 0.7363 [0.6670-0.8056]); hsa-miR-28-3p and hsa-miR-106a-5p (0.7324 [0.6597-0.8051]) and (hsa-miR-28-3p and hsa-let-7e-5p (ROC 0.7264 [0.6555-0.7974]), and association of three and four miRNAs: hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p and hsa-miR-28-3p (ROC 0.7102 [0.6506-0.7676]) and hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p and hsa-miR-542-5p (ROC 0.7053 [0.6543-0.7564]). Additionally, the prediction of targets and signaling pathways *in silico* showed that hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, and hsa-miR-28-3p regulate enriched genes in pathways associated with cancer. Therefore, In the present study it was demonstrated that the evaluation of serum expression of hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p and hsa-miR-542-5p can be used as a miRNAs signature for the less-invasive and early diagnostic of colorectal cancer.

Key words: Biomarker, miRNA, colorectal cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Câncer - epidemiologia, impacto econômico e importância do diagnóstico precoce	12
1.2 Câncer colorretal	14
1.3 Rastreamento do CCR	16
1.4 MicroRNAs	19
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Locais de realização do estudo.....	30
4.2 Estudo Clínico - Pacientes	30
4.3 Caracterização clínica dos casos	30
4.4 Delineamento experimental	31
4.4.1 Critérios de inclusão:	32
4.4.2. Critérios de exclusão:	33
4.5 Coleta das amostras.....	33
4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA	33
4.7 Amplificação das amostras pelo sistema Taqman Human pool A - Taqman Low Density Array (TLDA).....	35
4.8 Análise dos dados gerados pelo Taqman Low Density Array (TLDA)	36
4.9 Normalização das amostras	38
4.10 Validação dos miRNAs diferencialmente expressos encontrados entre os grupos.....	39

4.11 Predição <i>in silico</i> de genes regulados por miRNAs e as vias de sinalização envolvidas.....	40
5. Análise estatística	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Caracterização clínico demográfica dos pacientes	42
6.2 Perfil de expressão diferencial de miRNAs	45
6.3 Seleção dos miRNAs diferencialmente expressos	46
6.4 Classificação dos miRNAs diferencialmente expressos como preditores de malignidade.....	48
6.5 Validação de miRNAs preditores de malignidade	50
6.6 Avaliação da expressão de miRNAs preditores de malignidade em amostras de pacientes com lesões benignas de malignas.....	51
6.7 Análise discriminante do potencial dos miRNAs como biomarcador diagnóstico de CCR	52
6.8 Predição de alvos e vias de enriquecimento reguladas pelos miRNAs <i>in silico</i>	56
6.9 Associação da expressão de miRNAs	60
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÃO.....	71
9. REFERÊNCIAS	72
ANEXOS.....	82

1. Introdução

1.1 Câncer - epidemiologia, impacto econômico e importância do diagnóstico precoce

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), o câncer é um termo genérico que designa um amplo grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. Uma característica que define o câncer é a rápida multiplicação de células anormais, que se estendem para além dos seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo ou difundir-se para outros órgãos, em um processo chamado de metástase (IARC, 2018).

As principais alterações envolvendo células e tecidos no câncer são descritas como as Marcas Registradas do Câncer (do inglês *Hallmarks of Cancer*) e compreendem as seguintes características: crescimento auto-suficiente, insensibilidade aos sinais de anti-crescimento, replicações ilimitadas, evasão à apoptose, angiogênese e invasão de tecido e metástase, (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, duas características foram adicionadas como *hallmarks*, a reprogramação do metabolismo energético e o escape à imunovigilância (Figura 1) [HANAHAN; WEINBERG, 2011; FOUAD; AANEI, 2017].

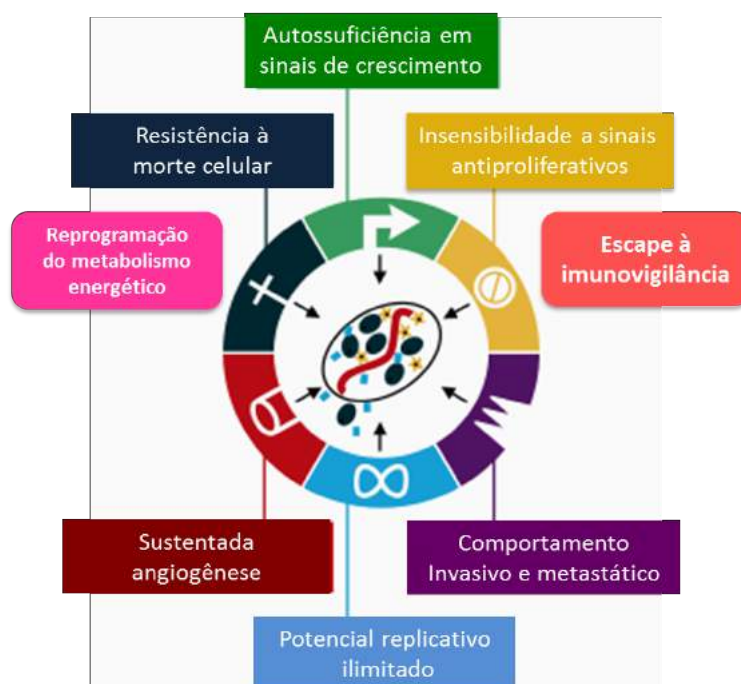


Figura 1. Diagrama das marcas registradas do câncer (do inglês: *hallmarks of cancer*), adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

O câncer enquanto doença de alta incidência e mortalidade é um dos grandes desafios para a saúde pública e representa a segunda causa de morte no mundo. A mortalidade do câncer se concentra em países em desenvolvimento e de baixa renda (70%) e o impacto econômico desta morbimortalidade é alto e cresce a cada ano. Segundo estimativa global, no ano de 2010 o impacto econômico foi de US\$ 1,16 trilhão (IARC, 2018).

Os tipos de câncer que causaram o maior número de mortes no mundo em 2018, de acordo com a OMS são: câncer pulmonar (1,8 milhões de mortes), colorretal (881 mil mortes), gástrico (783 mil mortes), hepático (782 mil mortes) e câncer de mama (627 mil mortes). Estima-se que 29 milhões de casos novos de câncer irão surgir até 2040, com uma expectativa de 16 milhões de mortes (Figura 2) [IARC, 2018].

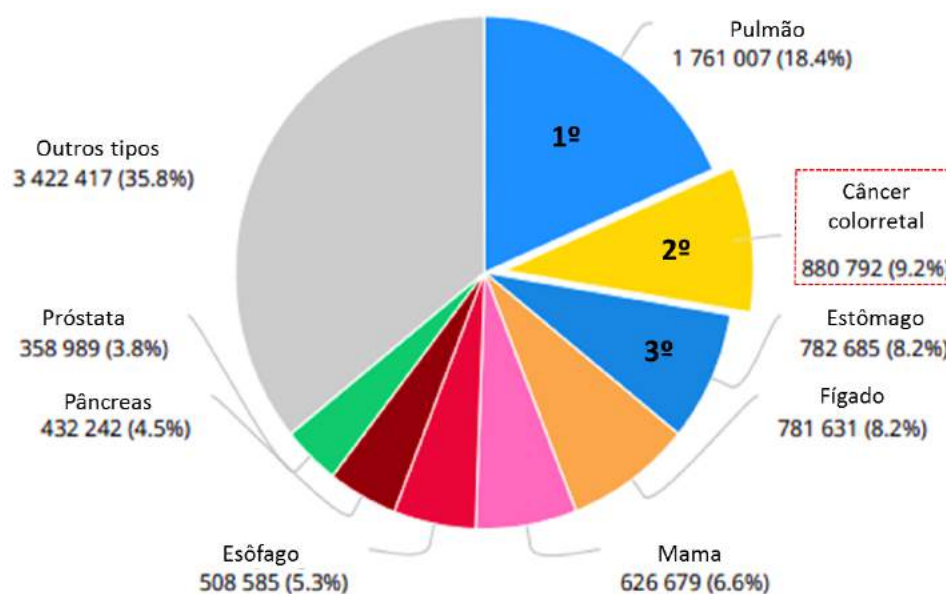


Figura 2. Mortalidade por tipo de câncer no mundo (adaptado de IARC, 2018).

No Brasil, foi estimado para o biênio 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos e 244 mil mortes por câncer em cada ano (INCA, 2018). Dentre os tipos de câncer no Brasil, à exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais frequente em homens (24.737 casos novos) e o segundo em mulheres (27.046 casos novos) [INCA, 2018].

Por se tratar de um problema de saúde pública com grande impacto social e estimativa crescente de novos casos, o diagnóstico precoce do câncer é um desafio necessário e urgente (ROSE e al., 2014).

1.2 Câncer colorretal

O CCR é uma doença complexa e multifatorial que progride ao longo de anos e envolve interações entre fatores genéticos, ambientais e alterações somáticas acumuladas no epitélio intestinal (WEITZ et al., 2005; BUCCAFUSCA, et al., 2019).

O CCR pode ser hereditário ou esporádico. O hereditário é responsável por 10 a 20% dos casos e está associados à predisposição genética, como síndromes familiares. As duas síndromes mais frequentes em pacientes com CCR hereditário são a polipose adenomatosa familiar (PAF) e o câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC) ou síndrome de Lynch (CHANG et al., 2017).

Na PAF as mutações no *APC*, um gene supressor tumoral, alteram a β -catenina que está associada a etapas de sinalização celular e afetam a apoptose e o crescimento das células, além da transcrição de genes envolvidos na proliferação celular como o oncogene *c-myc*. Com isso, ocorre a perda da atividade reguladora do ciclo celular e aumento da atividade proliferativa (NEKLASON et al., 2004).

Já o HNPCC é causado por mutações dos genes de reparo do DNA, *MMR* (do inglês: *mismatch-repair*), onde os critérios clínicos, apoiados por imunohistoquímica e testes moleculares para instabilidade de microssatélites (MSI) no tecido tumoral podem diferenciar um paciente com HNPCC do paciente com CCR esporádico. Quatro dos genes *MMR* podem ter importância na pesquisa de HNPCC, os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (TARANCÓN-DIEZ, et al., 2019).

O CCR esporádico é responsável por aproximadamente 80-90% dos casos e embora qualquer pessoa possa desenvolvê-lo, vários fatores estão associados a um risco aumentado para a doença (FRANK et al., 2017). Alguns desses fatores de risco podem ser evitados, como dieta com pouca fibra, falta de atividade física, obesidade, tabagismo e consumo excessivo de álcool (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Embora o controle dos fatores de risco diminua a chance de desenvolvimento de CCR, isso não seria suficiente para reduzir a necessidade de rastreamento (MOORE et al., 2017). Existem outros fatores que não se podem evitar e que também

predispõem o paciente ao CCR, como a história pessoal ou familiar de pólipos colorretais ou CCR, e as condições hereditárias já mencionadas no texto (BECK et al., 2011).

A sequência “adenoma-carcinoma” descrita por Day & Morson em 1978 é um dos conceitos fundamentais de desenvolvimento do CCR esporádico. Essa foi a primeira descrição da associação entre carcinoma e pólipos colorretais, baseada em observações clínicas e anatomopatológicas. A sequência adenoma-carcinoma descreve o passo a passo da progressão do CCR, partindo do epitélio normal e seguindo para estágios com diferentes graus de displasia até a formação de metástase (DAY & MORSON, 1978).

O pólipo é formado a partir de um crescimento anormal da mucosa do intestino que se projeta em sentido à luz do órgão. O pólipo hiperplásico não possui alterações malignas, mas é considerado como fator de risco para o CCR quando o indivíduo apresenta 5 ou mais pólipos na região proximal ou sigmoide, ou mais que 30 pólipos no cólon, ou ainda apresenta histórico familiar de primeiro grau com pólipos (DAVILA et al., 2006).

As anormalidades que contribuem para a patogênese do CCR ocorrem através da inibição de mediadores que alteram a proliferação celular (incluindo os genes supressores de tumores *APC*, *p53*) e por ativação de mediadores positivos à proliferação celular (proto-oncogenes *K-Ras* e *c-myc*) que promovem o crescimento do epitélio intestinal e levam a alterações no tecido epitelial normal, que evolui para pólipo adenomatoso e finalmente para CCR invasivo (COLEMAN; TSONGALIS, 2006).

A mutação no gene supressor de tumor *APC* marca as primeiras alterações epiteliais na sequência adenoma-carcinoma e leva à displasia da mucosa colônica normal, com potencial para formação de microadenoma. Em seguida, ocorre uma mutação no *K-ras*, e as células vão se tornando menos diferenciadas e mais displásicas transformando-se em um pólipo adenomatoso, que podem ser classificados como planos, pediculados ou sésseis. E por fim, a mutação no gene *p53* induz o fenótipo maligno e o adenoma adquire características de adenocarcinoma. Em sequência, o tumor pode se disseminar pela mucosa adquirindo a capacidade de produzir metástase (Figura 2) [DAY; MORSON, 1978; LESLIE et al., 2002; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018].

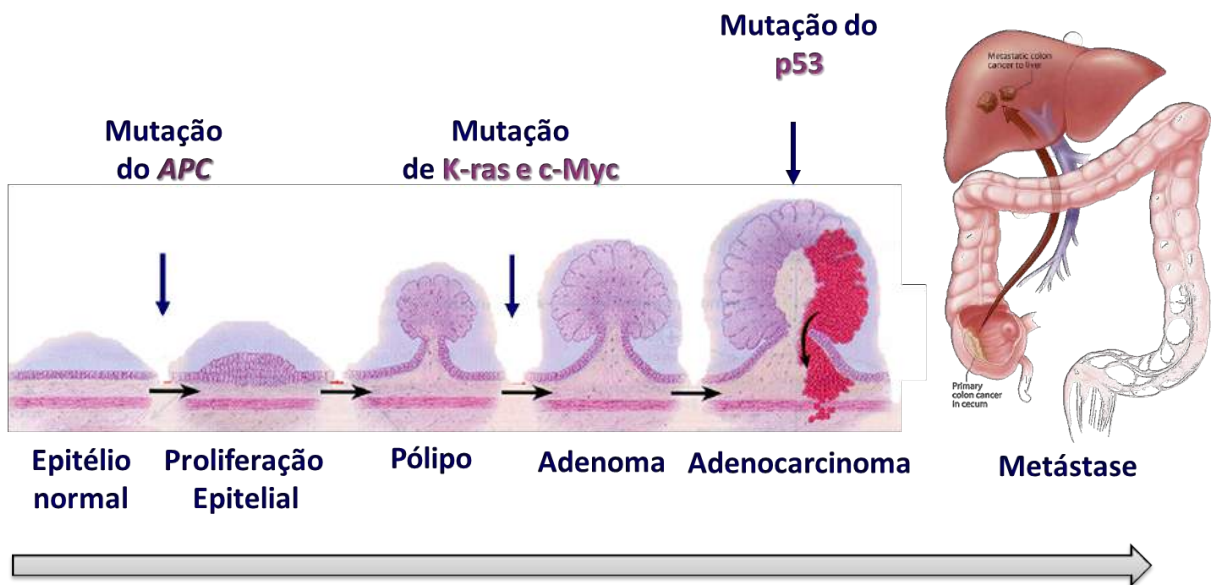


Figura 3. Sequência de eventos para carcinogênese e progressão tumoral com principais muta es. (Adaptado de Janne & Mayer, 2000)

O desenvolvimento dessa sequência ocorre de maneira lenta permitindo nesse período uma oportunidade de prevenir o desenvolvimento do CCR por meio de rastreamento (BOND, 2000). Com o rastreio busca-se identificar lesões precursoras e o CCR desde os seus primeiros estágios com o intuito de reduzir a incidência e mortalidade causada por essa doença.

1.3 Rastreamento do CCR

Os programas de rastreamento são responsáveis pela redu o de 50% na incidência e mortalidade associadas ao CCR através da remo o de pólipos pr -cancerosos e detec o de câncer em estágio inicial (LESLIE, 2002). Para que os programas de rastreamento sejam efetivos na clínica oncológica, o tipo de câncer estudado deve atender aos seguintes critérios: (I) ser responsável por altos níveis de morbidade e mortalidade, (II) ter disponíveis medidas terapêuticas eficazes para a fase precoce da doença e (III) a fase precoce da doença deve ter elevada prevalência na popula o (ROSS et al., 2010). O CCR atende aos critérios supracitados, pois apresenta alta incidência e, além disso, o seu desenvolvimento é

caracterizado como um processo dinâmico que envolve etapas definidas. A evolução dos pólipos adenomatosos pré-malignos até o CCR metastático envolve uma progressão linear de eventos específicos que pode ocorrer entre 10 a 15 anos, um período pré-clínico detectável bastante longo, que propicia condições ideais para a detecção precoce (RYAN, et al., 2016). Nesse contexto, o rastreamento para o CCR em estágio inicial poderia proporcionar sua identificação precoce gerando assim a possibilidade de um tratamento com melhor prognóstico, apresentando menor mortalidade e redução do impacto da doença (NAVARRO et al., 2017).

Os métodos de triagem, sigmoidoscopia, colonoscopia e testes de sangue oculto nas fezes, vêm reduzindo significativamente a taxa de mortalidade, principalmente através da detecção precoce de pólipos pré-cancerosos ou do CCR em estágio inicial. Dentre esses métodos, a colonoscopia é a técnica padrão para a detecção do CCR. Com ela é possível diagnosticar o CCR tanto em fases avançadas ou precoces, como também encontrar lesões precursoras e removê-las por polipectomia (WINAWER et al, 2011).

Embora a colonoscopia seja a opção de rastreamento mais comum, pesquisadores ainda precisam demonstrar sua eficácia em um estudo controlado randomizado, pois mesmo com tantas vantagens, sob uma perspectiva de política de saúde pública, a ênfase na colonoscopia é problemática por algumas razões: a qualidade e precisão da técnica ainda é variável, complicações como perfuração podem ocorrer, os custos do procedimento são altos e o mesmo necessita de anestesia para sua realização (ATKIN et al., 2003; HOFFMAN, et al., 2011; MAIA et al, 2012; SAGAWA et al, 2012). Além disso, muitos pacientes apresentam resistência para se submeter ao exame e preferem métodos alternativos.

Em 2008, o Serviço de Prevenção e Saúde dos EUA avaliou estrategicamente a eficácia de testes de rastreamento de CCR obedecendo à adesão de 50%, 80% e 100% dos pacientes ao teste. O trabalho mostra o intervalo de tempo de cobertura e a efetividade do teste. Quando a aderência foi relativamente alta em 80 e 100% a estratégia de colonoscopia foi a mais efetiva em termos de anos de vida ganhos, quando comparado com testes imunquímicos fecais. Quando a aderência global foi de apenas 50%, a estratégia de colonoscopia deixou de ser a mais efetiva, e os testes imunohistoquímicos fecais tiveram anos de vida maiores ou equivalentes aos da estratégia de colonoscopia. Os testes menos invasivos foram as melhores

alternativas em termos de anos de vida ganhos, uma vez que, possuem um maior número de adesão (ZAUBER et al., 2008).

O teste de sangue oculto, por sua vez, é menos invasivo, mais barato, prático, apresenta menores riscos e maior aceitação populacional, sendo importante para a realização de rastreamentos populacionais. Contudo, ele é suscetível a sofrer interferência de alimentos ou fármacos ingeridos, além de ser pouco sensível e específico, sendo necessária a complementação da investigação quando forem positivos, através de exame de observação direta ou endoscópica (RABENECK et al., 2012; BRENNER et al., 2017).

Embora a triagem rotineira por sangue oculto nas fezes e colonoscopia, tenham sido bem validada e tornado-se as melhores práticas aceitas para o CCR, é urgente a criação de ferramentas menos invasivas e mais precisas. Nesse sentido, a comunidade científica tem se desafiado a estudar marcadores que possam fornecer informações importantes sobre prevenção, diagnóstico, prognóstico e a resposta ao tratamento do CCR.

O perfil de expressão gênica de várias proteínas teciduais e plasmáticas já foi avaliado e levou à identificação de padrões relacionados ao prognóstico da doença e resistência ao tratamento, bem como à descoberta de novos alvos terapêuticos.

Nesse sentido, os marcadores plasmáticos mais utilizados no CCR são o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o antígeno de carcinoma (CA19-9). No entanto, eles não são efetivos no diagnóstico de CCR devido a sua baixa sensibilidade e especificidade. Portanto, limita-se a determinar estadiamento, prognóstico e possível resposta terapêutica para o CCR (THIRUNAVUKARASU et al., 2011; STIKSMA et al., 2014; TOIYAMA et al., 2014). Dessa forma são inadequadas para o diagnóstico precoce.

O perfil de metilação gênica também foi estudado no CCR e tem apontado alguns genes candidatos que podem servir como biomarcadores de rastreamento, no entanto, esses mesmos estudos apontam para a necessidade de análises teciduais mais complexas que incluem um extenso perfil de genes metilados (metiloma ou epigenoma) que interferem de forma epigenética na progressão tumoral in situ (IRIZARRY et al., 2009; MOKARRAM et al., 2009; MORI et al., 2011; HINOUE et al., 2012; SIMMER et al., 2012).

Nesse contexto, é de extrema importância a busca por testes menos invasivos, rápidos e que possam ser realizados em larga escala possibilitando a detecção de lesões precursoras além dos tumores formados em uma população. Nesse sentido, moléculas como miRNA derivadas do tumor ou da resposta do organismo ao tumor têm sido avaliados como potenciais biomarcadores de câncer (STRUBBERG; MADISON, 2017).

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não-codificantes de 19-30 nucleotídeos, que exercem sua atividade principalmente pela repressão da tradução ou promoção da degradação do RNA mensageiro (mRNA). Eles atuam como reguladores pós-transcricionais afetando vários processos fisiológicos (GARZON et al., 2010).

O primeiro miRNA, Lin4 (do inglês *lineage-deficient-4*), foi descoberto em 1993 e associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*. Os pesquisadores descobriram que o Lin4 não codificava proteínas, mas sim um par de RNAs. Esses RNAs eram complementares a vários sítios da região 3' UTR do mRNA Lin14, regulando sua tradução e contribuindo para o desenvolvimento do *C. elegans* (LEE et al., 1993). Após alguns anos, homólogos desses RNAs foram identificados em humanos e outras espécies, mas não eram expressos em estágios de desenvolvimento, e sim em tipos celulares. Desde então, miRNAs foram encontrados em diversas espécies de seres vivos, sugerindo serem reguladores antigos e essenciais (MCCALL et al., 2017).

Os novos miRNAs são nomeados pela identificação da espécie seguida da abreviação miR, relacionado a miRNAs maduros, ou mir para o gene ou o precursor do miRNA., e em sequência temos o número em ordem crescente de descoberta, por exemplo, para um miRNA maduro descoberto em humano, com numeração sequencial 515 a sua nomenclatura seria (hsa-miR-515). Ainda, os miRNAs que tem 1 ou 2 nucleotídeos diferentes em uma mesma sequência específica, mantém o mesmo número e são acrescidos de uma letra minúscula ao nome, por exemplo: hsa-miR-515a e hsa-miR-515b. miRNAs precursores diferentes podem produzir miRNAs maduros idênticos, nesse caso recebem a mesma numeração acrescida de

um número em sequência de descoberta, por exemplo: *hsa-mir-515-1* e *hsa-mir-515-2* que produzem o hsa-miR-515, os miRNAs não maduros devem ser escritos em itálico para diferenciar da sequência do miRNA maduro. Existem alguns miRNAs descobertos anteriormente ao sistema de nomenclatura, o Lin-4 e o Let-7 que foram o primeiro e segundo miRNAs identificados. Nesse caso, os miRNAs foram nomeados de acordo com o contexto de descoberta (fases de desenvolvimento larval da *Caenorhabditis elegans*) [AMBROS et al., 2003; DESVIGNES et al., 2015].

Atualmente, 1917 miRNAs foram descritos no genoma humano de acordo com o banco de dados de miRNAs, o mirBase (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, consulta realizada em 28/03/2019), e cada um controla potencialmente centenas de genes alvo, 30 a 90% dos genes humano podem ser regulados por miRNAs (LOZAR et al., 2019), com um importante papel supressor ou oncogênico de tumor, tornando-se uma peça chave no estudo de biomarcadores.

A biogênese dos miRNAs inicia-se no núcleo quando a RNA polimerase II transcreve genes pri-miRNAs chamados de precursores maiores. Ainda no núcleo eles são processados pela enzima RNase III Drosha, resultando em um transcrito menor, o miRNA precursor (pre-miRNA) que possui uma estrutura em *stem-loop* de aproximadamente 70 nucleotídeos, contendo o miRNA maduro localizado em um dos braços. O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5 e posteriormente processado pela enzima RNase III Dicer, gerando transcritos de fita dupla, denominados miRNAs maduros. Este produto é incorporado a um complexo de silenciamento induzido por RNA denominado RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*) que é composto pelas proteínas Dicer e Argonata (AGO). Neste complexo, um filamento é retido como o miRNA maduro, enquanto o outro filamento é geralmente degradado. Este complexo é agora capaz de regular seus genes-alvo (MEOLA et al., 2009). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que essa fita que seria degradada, também pode regular funções importantes (VISHNOI & RANI 2017).

Os miRNAs maduros interagem com moléculas de RNA complementares principalmente na região 3' não traduzida (UTR) para suprimir a tradução da proteína de duas formas: ligação da região localizada entre a posição 2 e 8 da região 5' do miRNA (*seed*), com a região do 3'UTR do seu transcrito alvo pela

complementaridade de Watson-Crick (GARZON et al., 2010); ou a região 5'UTR ou a *open reading frame* (ORF) do mRNA alvo (IORIO & CROCE 2012). Essa complementaridade pode levar a degradação e desestabilização do RNA, levando ao bloqueio da tradução do mRNA (JONAS; IZAURRALDE, 2015).

Os miRNAs com complementaridade perfeita ou quase perfeita a regiões onde se codificam proteínas (5'UTR do mRNA) induzem a via de interferência mediada por RNA (RNAi). Nesse sentido, o mRNA é clivado pelas ribonucleases associadas à miRNAs presentes no *multiprotein RNA induced-silencing complex* (miRISC), que tem como consequência a degradação do RNA alvo (ESQUELA-KERCHER & SLACK, 2006). Essa complementaridade parcial entre o miRNA e seu alvo transcrito mostra que um único miRNA é capaz de regular simultaneamente centenas de genes (Figura 4).

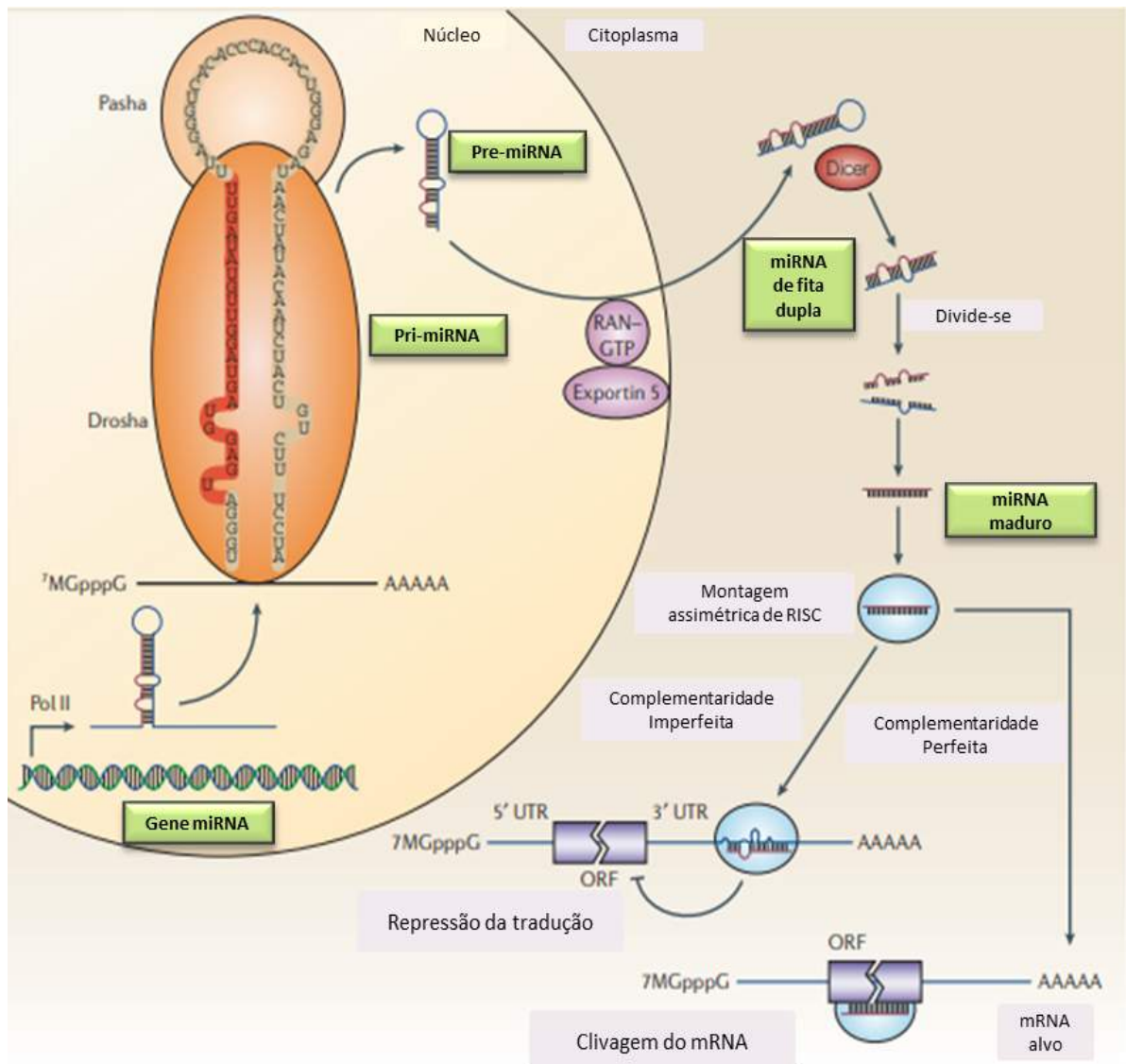


Figura 4. Biogênese dos miRNAs (Adaptado de Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

Os miRNAs desempenham papel crítico na maioria das redes de sinalização celular e sua alteração está associada a muitos tipos de câncer, incluindo câncer colorretal, câncer de mama, câncer gástrico, câncer de pulmão e sarcomas. Esse processo também altera a expressão de genes que medeiam processos importantes na tumorigênese, tais como: inflamação, regulação do ciclo celular, metabolismo celular, resposta ao stress, diferenciação, apoptose, e invasão (FARAZI *et al*, 2013). Os miRNAs podem atuar como supressores tumorais ou oncogenes (Figura 4). Pequenas mudanças no nível de expressão de alguns miRNAs podem ter um grande impacto biológico (GARZON *et al*, 2010; XIAO *et al*, 2013).

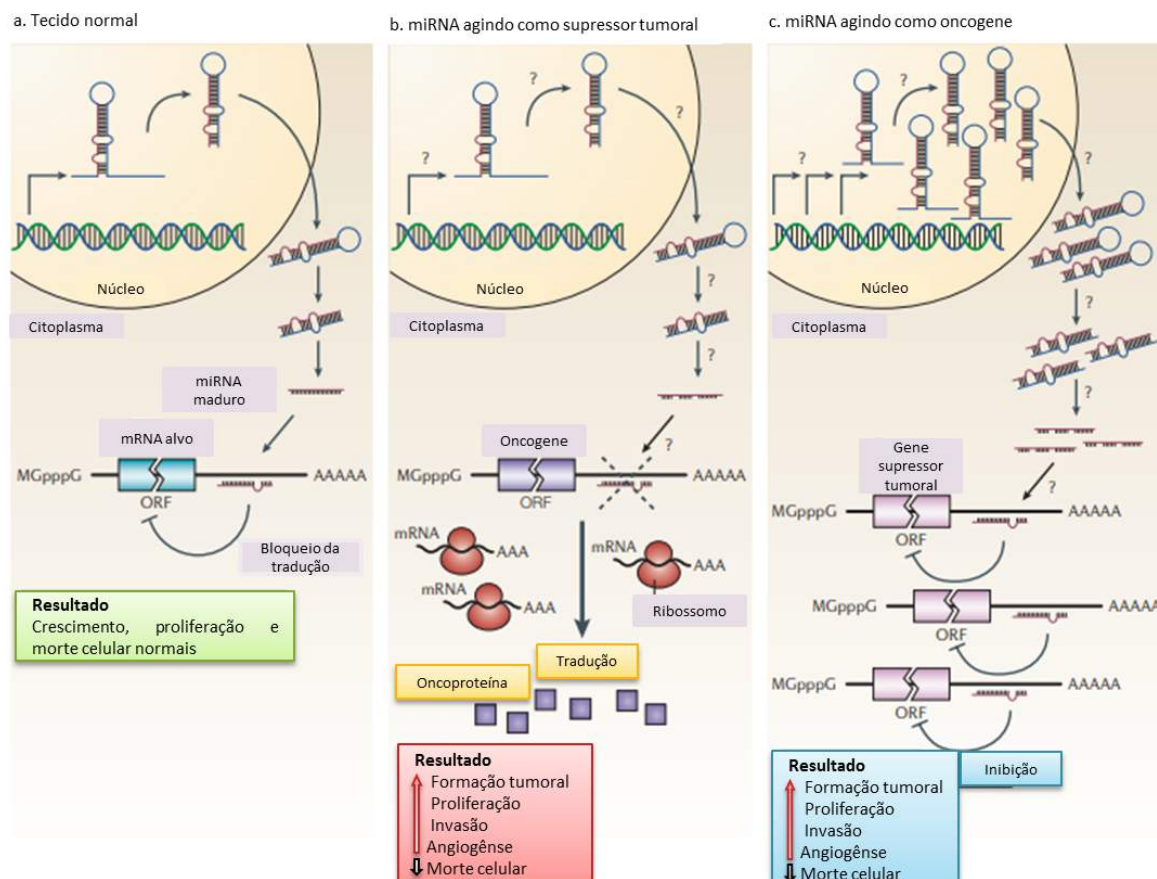


Figura 5. Biogênese dos miRNAs no câncer (supressores de tumor e oncogenes). a - Em tecidos normais. b - A redução ou deleção de um miRNA que funciona como um supressor de tumor. c - A amplificação ou superexpressão de um miRNA que tenha um papel oncogênico. Níveis aumentados de miRNA maduro podem ocorrer devido à amplificação do gene miRNA, um promotor constitutivamente ativo, maior eficiência no processamento de miRNA ou aumento da estabilidade do miRNA (indicado por pontos de interrogação) [Adaptado de Esquela-Kerscher & Slack, 2006].

No caso do CCR, uma conclusão comum dos estudos realizados é que a expressão de certos miRNAs é consistentemente alterada quando comparada com os tecidos não tumorais, o que corrobora a hipótese de que a expressão exacerbada de miRNAs tem um papel na iniciação e desenvolvimento do CCR (SCHETTER et al., 2012; TOKARZ; BLASIAK, 2012). Em muitos tipos de câncer, incluindo o CCR, os níveis de expressão do miR-21 estão alterados e promovem a migração celular e invasão de células carcinogênicas (WU et al., 2017), enquanto a família de miRNAs miR-143/145 inibe o crescimento celular e se encontra regulada negativamente no CCR (SCHEPELER et al., 2008).

Entre os miRNAs com maior expressão no CCR, destaca-se o miR-135b. Este miRNA tem como alvo o gene APC, um gene supressor tumoral clássico, importante no processo de carcinogênese (CRISTOFARO et al., 2015).

Uma das vantagens da realização de estudos com miRNAs em humanos é que a detecção de miRNAs em fluidos corporais como sangue apresenta uma estabilidade notável quando comparado com outros tipos de amostras. Por exemplo, o miR-141 no plasma de pacientes com CCR foi associado a metástases e prognóstico reservado. Ainda, a presença do miR-29a no soro tem um forte potencial como um biomarcador para detecção precoce de metástases hepáticas em pacientes. Já o miR-29c foi identificado como um preditor de recidiva precoce no CCR (NG et al., 2009; HUANG et al., 2010).

A família do miR-34 apresenta três membros, miR-34a, miR-34b e miR-34c, regulados negativamente no câncer de pulmão, mama e outros tipos de neoplasias. Todos os três membros da família regulam o gene supressor tumoral *p53* e o seu papel também é evidenciado pela sua rede de mRNA alvo, afetando a expressão de proteínas do ciclo celular como a quinase 4 dependente de ciclina (CDK4) e proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 (LI et al., 2013; OKADA et. al., 2014).

Giráldez e colaboradores (2013), por sua vez, realizaram um amplo perfil de miRNA plasmáticos, identificando miR-15b, miR-19a, miR-19b, miR-29a, e miR-335 como marcadores úteis na discriminação de pacientes com CCR de indivíduos saudáveis.

Dessa forma, hipotetizamos que a análise da expressão de miRNAs durante toda a sequência linear de desenvolvimento do CCR desde o pólipo até a metástase apresenta um potencial para identificação de uma assinatura de miRNAs que possibilite o diagnóstico precoce de CCR.

2. Justificativa

O CCR é um dos tumores mais frequentes no mundo. Sabe-se que a taxa de sobrevivência em 5 anos de pacientes que tiveram a detecção do câncer em estágio inicial é de 90%, nove vezes maior que a do CCR em estágio IV (avançado) 10% (SIEGEL et al., 2012). No Brasil, o CCR apresenta uma incidência alarmante, sendo o diagnóstico tardio uma ocorrência comum, o que ocasiona altas taxas de morbidade e mortalidade. As formas convencionais de rastrear o CCR, a colonoscopia e o exame de sangue oculto nas fezes, vêm reduzindo significativamente a taxa de mortalidade em países desenvolvidos (WINAWER et al., 2011). No entanto, mesmo com vantagens, sob uma perspectiva de política de saúde pública, a colonoscopia apresenta um alto custo e pouca adesão, pois 40% dos adultos elegíveis para a idade de rastreamento não se submetem à colonoscopia devido à invasividade e riscos inerentes a técnica já o exame de sangue oculto nas fezes não é sensível (BRAY et. al., 2017). Nesse sentido, a realização de estudos que objetivam a identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce menos invasivo de CCR com potencial para melhorar as taxas de rastreamento são necessários e urgentes. Sob essa perspectiva acumulam-se fortes evidências na literatura demonstrando que os miRNAs estão presentes no sangue humano em uma forma altamente estável e despontam como evento importante na carcinogênese e progressão tumoral de várias neoplasias (YOU et. al., 2019; USUBA et al., 2019).

Dessa forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores para o rastreamento do CCR a partir da análise da expressão de miRNAs séricos nas diferentes fases de desenvolvimento do CCR.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Identificar um perfil de expressão diferencial de miRNAs plasmáticos para o diagnóstico precoce de câncer colorretal.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar miRNAs no plasma de voluntários saudáveis, pacientes com pólipos hiperplásicos, adenomas, câncer colorretal e câncer colorretal com metástase;
- ✓ Comparar o perfil de expressão de miRNAs plasmáticos obtidos de amostras de pacientes com pólipos hiperplásicos e adenomas dos grupos câncer colorretal e câncer colorretal metastático;
- ✓ Validar os miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos estudados;
- ✓ Identificar os mRNAs-alvos regulados pelos miRNAs utilizando métodos de predição *in silico*.
- ✓ Identificar vias de sinalização potencialmente reguladas pelo conjunto de mRNAs-alvos;
- ✓ Avaliar a associação dos miRNAs com os dados sócio-demográficos;

4. Material e métodos

4.1 Locais de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do câncer (LAFICA), na Universidade Federal do Ceará (UFC), em parceria com os hospitais: Hospital Universitário Walter Cantídio, Hospital Geral Dr. César Cals, Instituto do câncer do Ceará-Hospital Haroldo Juaçaba e o laboratório NEOGENE do AC Camargo Cancer Center.

O recrutamento dos pacientes, coleta de amostras, dados clínicos e anatomopatológicos, foi realizado nos hospitais supracitados, já o processamento das amostras e extração do RNA foi realizado no LAFICA. A avaliação da expressão, validação e análise dos miRNAs foi realizado no laboratório NEOGENE.

4.2 Estudo Clínico - Pacientes

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) pelas instituições participantes: Instituto do Câncer do Ceará/Hospital Haroldo Juaçaba; Hospital Universitário Walter Cantídio/Universidade Federal do Ceará – HUWC/UFC e Hospital Geral Dr. César Cals - HGCC, sob o número 3.047.394 (ANEXO 1). 110 (cento e dez) pacientes foram convidados para participar do estudo voluntariamente mediante preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a ficha clínica (ANEXO 2 e 3), respectivamente.

4.3 Caracterização clínica dos casos

As características macro/microscópicas das neoplasias foram colhidas dos relatórios cirúrgicos e dos laudos anatomopatológicos originais. Os laudos anatomopatológicos foram revisados por dois patologistas colaboradores do trabalho. A ficha clínica dos pacientes foi obtida pela revisão dos prontuários hospitalares e por entrevistas ambulatoriais com os pacientes recrutados ou seus familiares/acompanhantes. Informações médicas e epidemiológicas dos pacientes foram avaliadas somente após obtenção do TCLE. Todos os dados foram acondicionados em planilha Excel de forma codificada, a fim de garantir o sigilo dos dados e o anonimato dos pacientes (ANEXO 4). O delineamento experimental está representado em um fluxograma na figura 5.

4.4 Delineamento experimental.

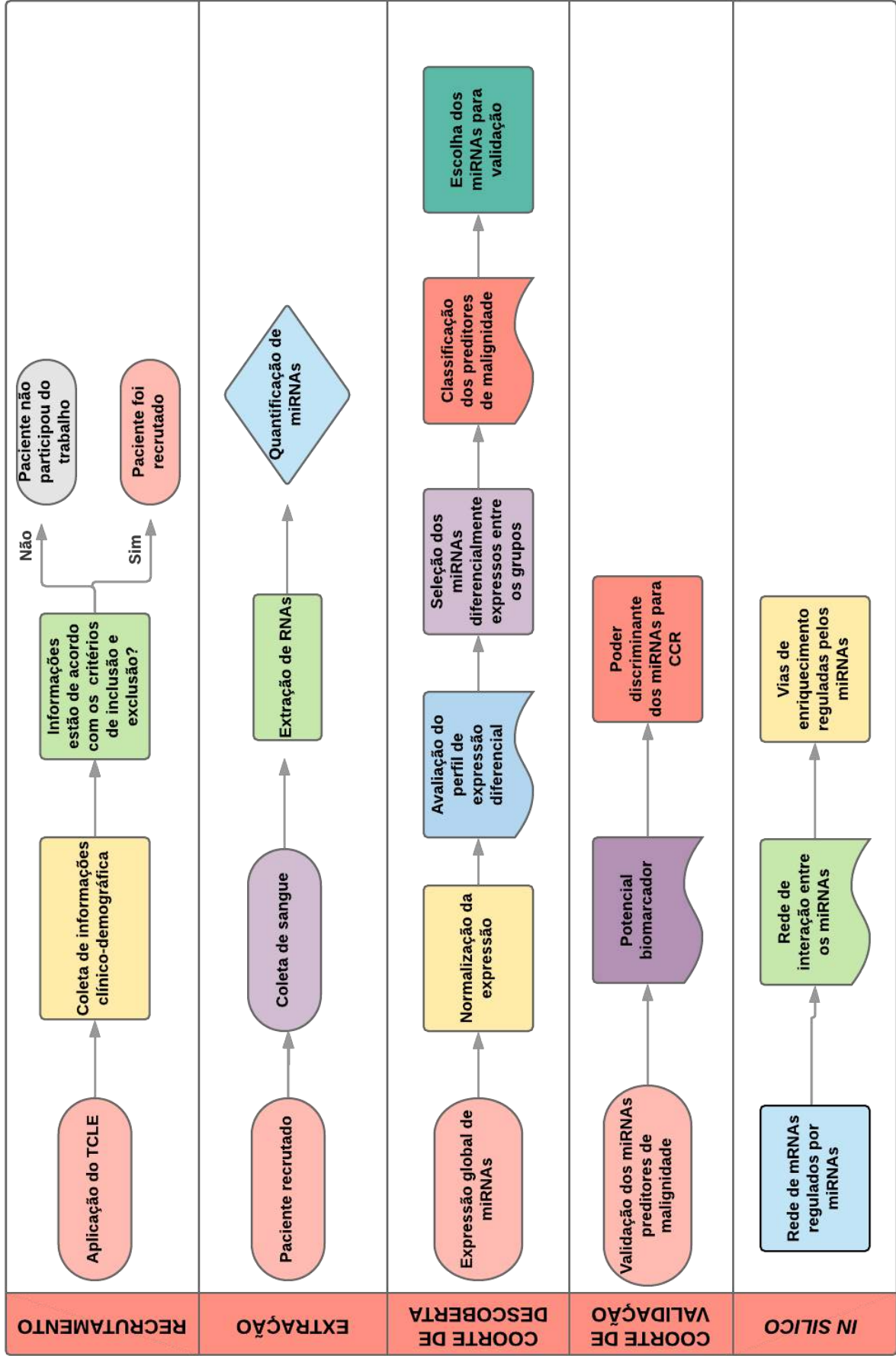


Figura 5. Delineamento do estudo.

O recrutamento foi realizado por meio de entrevistas com os pacientes e/ou familiares/acompanhantes para avaliação dos critérios de inclusão e exclusão a fim de minimizar a variação dentro da população do estudo. Nesse momento, os pacientes receberam todas as informações sobre o estudo e foram convidados a participar, preenchendo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a ficha clínica. Os critérios de inclusão e exclusão e o número amostral seguem descritos no Item "Critérios de Inclusão e exclusão" a seguir:

4.4.1 Critérios de inclusão:

- **Voluntário saudável (n=28)**; Indivíduos saudáveis, maiores de 18 anos de idade com colonoscopia recente confirmando ausência de lesões colorretais.
- **Pacientes com pólipos hiperplásicos (n=20)**: Pacientes maiores de 18 anos com pólipos hiperplásicos maiores que 10 mm, retirados com procedimento de colonoscopia (polipectomia).
- **Pacientes com adenoma (n=24)**: Pacientes maiores de 18 anos com adenoma maior que 10 mm, ou que apresentem alto grau de displasia ou 20% no mínimo de componente viloso retirados com procedimento de colonoscopia (polipectomia).
- **Pacientes com câncer colorretal inicial (CCRi - estágio inicial I, II e III, n=20)**: Pacientes maiores de 18 anos, com CCR estágios iniciais; neoplasia maior que 1,0 cm (descritos em biópsia, conforme laudo de médico patologista).
- **Pacientes com câncer colorretal com metástase à distância (estádio avançado, n=18)**: Pacientes maiores de 18 anos, com CCR e metástase, estágio avançado; neoplasia CCR ou pós ressecção cirúrgica apresentando doença em atividade.

4.4.2. Critérios de exclusão:

Menores de idade; diagnóstico clínico de polipose adenomatosa familiar (FAP) ou de Síndrome de Lynch; presença de mais de 10 adenomas colorretais; Diagnóstico de câncer em outro sítio no momento do recrutamento; doença inflamatória do intestino (IBD); diabetes; quimioterapia ou radioterapia no momento da coleta de sangue; exame colonoscópico incompleto; preparação inadequada para a colonoscopia e presença de hemólise no plasma.

4.5 Coleta das amostras

As amostras de sangue foram coletadas de pacientes diagnosticados com CCRi e CCR metastático antes do início do tratamento; pacientes com pólipos hiperplásicos, adenoma e voluntários sadios, antes do procedimento endoscópico.

Após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido e a obtenção das assinaturas do paciente ou do responsável, foi feita punção venosa para coleta de 16 mL de sangue em frascos para coleta contendo EDTA. A punção foi realizada por profissional qualificado utilizando material e procedimentos padronizados de coleta, assim como o armazenamento e transporte de sangue até o laboratório. Tais amostras foram centrifugadas para coleta do plasma (2500 rpm, 4°C durante 5 min), e no mesmo dia foi realizada a extração de RNAs. Em seguida, os tubos foram identificados com numeração assegurando sigilo da identidade dos consentidores e armazenados à -70°C para posterior quantificação.

4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Foi realizada a extração de RNA, incluindo miRNAs de todas as amostras pelo kit comercial *miRNeasy* qRT-PCR miRNA *Detection Kit* – (Qiagen, Valência, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Utilizamos para lise das amostras o tiocianato de fenol e guanidina que também inibe RNases, e purificamos o lisado com membrana.

As amostras foram homogeneizadas no reagente de Lise e em seguida adicionamos clorofórmio, que permite a separação do homogenato em duas fases:

aquosa e orgânica por centrifugação. O RNA fica na fase aquosa, superior, enquanto o DNA e as proteínas dividem-se na interfase e na fase orgânica, inferior. A fase aquosa superior foi coletada e em seguida o etanol foi adicionado para proporcionar condições de ligação apropriadas para todas as moléculas de RNA. A amostra foi então transferida para a coluna de spin RNeasy MinElute, onde o RNA total, incluindo o miRNA, se ligam à membrana, e o fenol e outros contaminantes são eficientemente lavados com tampões específicos fornecidos no kit. Por fim, o RNA total foi então eluído em 14µL de água livre de RNase e logo em seguida acondicionado à -70°C (Figura 7).

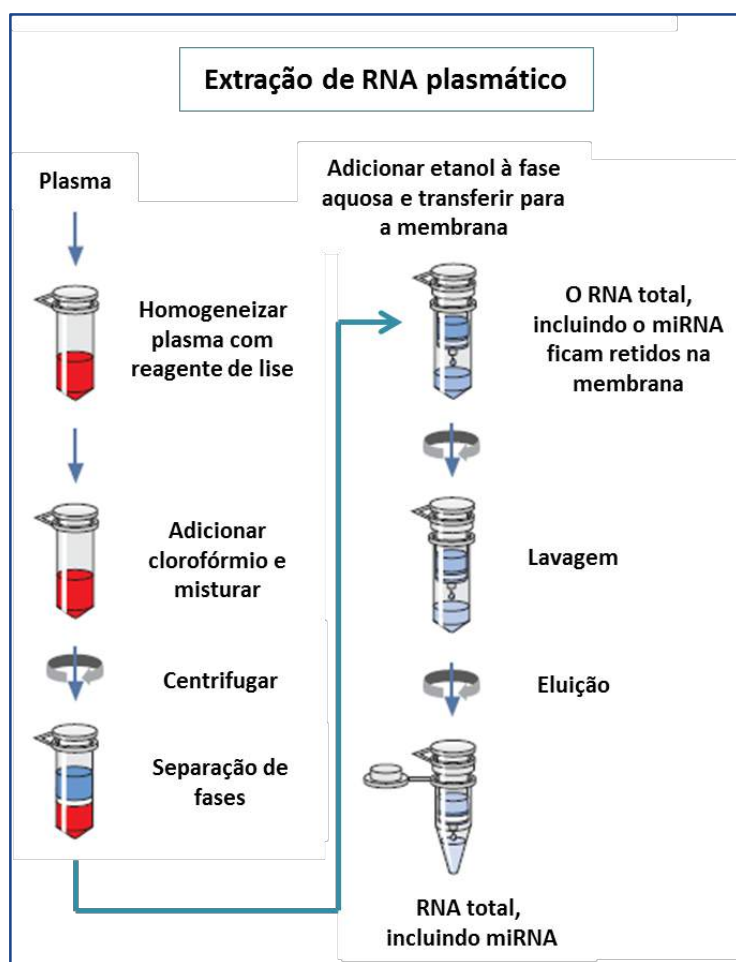


Figura 7. Extração de RNA plasmático. Fonte: *miRNeasy Serum/Plasma Handbook - Qiagen.*

A quantificação do RNA foi realizada em aparelho espectrofotômetro (*Thermo Scientific™ NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*), para obtenção das absorvâncias A260nm/280nm e A260/230nm. Esses valores sugerem contaminação do RNA (amostra) com DNA, fenol e outros contaminantes. A relação de absorvância das amostras se apresentaram dentro da normalidade, em média: (A260nm/280nm = 2; A260/230nm = 1,8).

Para a síntese de cDNA foi utilizado 75 ng de RNA total e 4,5 µL do mix de reação Megaplex™ RT Primers A (*Applied Biosystems*) em um volume final de 7,5µL de reação por amostra, segundo as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). Os ensaios utilizados detectam e quantificam pequenas quantidades de miRNA na sua forma madura.

4.7 Amplificação das amostras pelo sistema *Taqman Human pool A - Taqman Low Density Array (TLDA)*

Uma vez convertido em cDNAs, esses miRNAs foram submetidos a uma etapa de pré-amplificação utilizando o Kit Megaplex™ PreAmp Primers Human Pool A e TaqMan® Master Mix (*Applied Biosystems*). Em seguida, o produto pré-amplificado resultante foi utilizado para detecção da expressão de miRNAs por TLDA.

A análise de expressão global foi realizada na plataforma A (*card* de MicroRNA Humano Taqman Low Density Array (TLDA) A v2.0 (*Applied Biosystems*), contendo um total de 384 ensaios de miRNA, para cada amostra de paciente. Foram utilizados 5 pacientes por grupo nesta fase de avaliação da expressão de miRNAs. Nessa plataforma estavam incluídos os controles endógenos.

Para o ensaio foram adicionados 450 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix AmpErase® UNG 2X (*Applied Biosystems*), 9 µL do produto amplificado e 441µL de água nuclease-free. Após *spin*, um volume de 100 µL foi transferido para 8 poços do *card*, totalizando 800 µL. O *card* foi centrifugado por 1 minuto a 1200 rpm, a 4°C, para distribuir o produto uniformemente para os 384 poços (*micro-wells*), selado e levado ao Biosystems Prism 7900HT Fast Real-Time PCR sequence detection System (*Applied Biosystems*) para quantificar os níveis de expressão de cada miRNA.

4.8 Análise dos dados gerados pelo *Taqman Low Density Array* (TLDA)

Fizemos uma coorte de descoberta com 25 pacientes (5 pacientes de cada grupo), a fim de encontrar miRNAs diferencialmente expressos para posterior validação em uma população maior, com todos os pacientes (110). Para identificar miRNAs diferencialmente expressos nos grupos controle (voluntários saudáveis), pólipos hiperplásicos, adenomas, cânceres colorretais iniciais e cânceres colorretais metastáticos, analisamos os miRNAs usando o *Taqman Low Density Array* (TLDA), nos 25 pacientes que foram escolhidos levando em consideração a integridade do RNA, portanto, as amostras com melhor pureza foram incluídas nessa fase. O gênero e idade do paciente também foi uma das considerações, com o intuito de ter uma maior diversidade nesse grupo de amostras (homens e mulheres de idades variadas). E por fim, os pacientes fumantes com comorbidades foram evitados nessa fase com o objetivo de se ter o mínimo possível de alterações, como demonstrado na tabela 1 (coorte de descoberta).

Tabela 1. Caracterização sócio-demográfica da população de estudo no coorte de descoberta.

ID	DIAGNÓSTICO	LOCAL	METÁSTASE	SEXO	IDADE	RAÇA	ESCOLARIDADE	FUMANTE	USO MEDICAÇÃO	HISTÓRICO FAMILIAR	GRAU PARENTESCO	TIPO TUMOR
71	CONTROLE	X	X	FEM	44	PARDA	SUPERIOR COMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	TIA/AVÔ	PÂNCREAS/ PÂNCREAS
73	CONTROLE	X	X	FEM	49	BRANCA	MÉDIO INCOMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	PAI/AVÔ	PROSTATA/ LEUCEMIA
89	CONTROLE	X	X	FEM	33	BRANCA	MÉDIO COMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	TIA	MAMA
91	CONTROLE	X	X	MASC	36	PARDA	SUPERIOR INCOMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	IRMÃ	CCR
94	CONTROLE	X	X	MASC	55	PARDA	FUNDAMENTAL COMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	IRMÃ	TIREOIDE
21	PÓLIPO HIPERPLÁSICO	X	X	FEM	40	PARDA	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	AVÔ	ESTÔMAGO
34	PÓLIPO HIPERPLÁSICO	X	X	MASC	48	PARDA	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
83	PÓLIPO HIPERPLÁSICO	X	X	FEM	44	PARDA	MÉDIO COMPLETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
109	PÓLIPO HIPERPLÁSICO	X	X	FEM	49	PARDA	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	EX	NÃO	SIM	MAE/AVÔ	BOCA/ ESTÔMAGO
113	PÓLIPO HIPERPLÁSICO	X	X	MASC	46	BRANCA	FUNDAMENTAL COMPLETO	EX	NÃO	SIM	AVÔ	PROSTATA
30	ADENOMA TUBULAR	RETO	X	MASC	55	PARDA	SUPERIOR COMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	PAI	ESTÔMAGO
44	ADENOMA TUBULAR	RETO	X	FEM	73	AFRODESCENDENTE	MÉDIO INCOMPLETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
90	ADENOMA TUBULAR	RETO	X	MASC	43	PARDA	MÉDIO COMPLETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
104	ADENOMA TUBULAR	RETO	X	FEM	67	BRANCA	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	PAI	ESÔFAGO
112	ADENOMA TUBULAR	RETO	X	FEM	57	PARDA	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	PAI/TIA	GARGANTA/ PULMÃO
14	CCR	RETO	X	MASC	37	PARDA	FUNDAMENTAL COMPLETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
19	CCR	RETO	X	MASC	72	BRANCA	ANALFABETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
66	CCR	RETO	X	MASC	69	AFRODESCENDENTE	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	EX	SIM	NÃO	X	X
70	CCR	COLON	X	FEM	54	PARDA	SUPERIOR INCOMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	PAI/TIO	PULMÃO/ PRÓSTATA
81	CCR	COLON	X	FEM	62	BRANCA	FUNDAMENTAL INCOMPLETO	NÃO	SIM	NÃO	X	X
27	CCR METASTÁTICO	COLON	HEPÁTICA	FEM	47	BRANCA	MÉDIO COMPLETO	EX	NÃO	SIM	MÃE/TIO	PULMÃO/ PULMÃO
31	CCR METASTÁTICO	COLON	PULMONAR BILATERAL E SUPRA RENAL	FEM	72	PARDA	SUPERIOR COMPLETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
43	CCR METASTÁTICO	RETO	HEPÁTICA E PULMONAR	MASC	50	BRANCA	SUPERIOR COMPLETO	NÃO	SIM	SIM	TIO/SOBRINHO	CCR/PULMÃO
52	CCR METASTÁTICO	RETO	HEPÁTICA (MÚLTIPLOS NÓDULOS)	MASC	48	PARDA	ANALFABETO	NÃO	NÃO	NÃO	X	X
87	CCR METASTÁTICO	RETO	HEPÁTICA	MASC	68	BRANCA	FUNDAMENTAL COMPLETO	NÃO	NÃO	SIM	TIO	PULMÃO

A partir dos dados gerados no Biosystems Prism 7900HT avaliamos o *baseline*, o *threshold* foi ajustado em 0,1 para todas placas. O ciclo em que a curva ultrapassou o limiar de detecção de fluorescência foi utilizado como valor para quantificação da expressão. Em seguida os dados foram exportados para o excel para gerar uma tabela em formato .csv contendo os *Cqs* (*cycle quantification*) de todas as amostras e seus miRNAs. Também foi criado um arquivo *template* onde constava a informação de qual grupo cada amostra pertencia. Ambos foram carregados na plataforma R para início da análise. Foi então utilizado o programa BRB ArrayTools v. 4.4.0. para que houvesse a normalização dos dados e obtenção do valor relativo de expressão.

4.9 Normalização das amostras

A partir das amostras desses pacientes, foram gerados dados de expressão diferencial dos miRNAs. Verificamos durante essa fase que uma das amostras do grupo câncer colorretal metastático (amostra 27) apresentou um número muito superior de Cqs indeterminados (115 miRNAs apresentaram Cq 40) em comparação com as outras amostras, como observado, portanto esta foi removida. Foi realizada a conversão dos Cqs não determinados, em 40 ciclos. Os miRNAs com frequência de Cq 40 superior à 5% em todos os grupos foram removidos, inclusive os miRNAs com expressão muito baixa ou nula, restando 262 miRNAs para serem analisados. Os miRNAs com *Fold Change* (FC) igual ou superior a 1,5, ou inferior a -1,5 foram considerados diferencialmente expressos.

As amostras foram normalizadas com base na média geométrica global da expressão gênica dos miRNAs indicados. Dessa forma, foi obtida uma menor variação intra-amostras. Em seguida os dados foram normalizados por *quantile normalization*, utilizando o programa BRB ArrayTools v. 4.4.0. de forma a deixar a distribuição da expressão ainda mais homogênea entre as amostras.

4.10 Validação dos miRNAs preditores de malignidade

A validação dos miRNAs de interesse identificados a partir do TLDA foi realizada utilizando primers específicos para cada miRNA encontrado diferencialmente expresso nos grupos de estudo, ensaios Taqman MicroRNA Individual (*TaqMan™ Fast Advanced Master Mix - Applied Biosystems*) e placas de 384 poços (377 miRNAs + controles endógenos). A placa foi então selada, centrifugada por 1 minuto a 1200 rpm, a 4°C, e levada ao *Biosystems Prism 7900HT Fast Real-Time PCR sequence detection System (Applied Biosystems)* para quantificar os níveis de expressão dos miRNAs em cada paciente.

Na validação, a expressão de quatro miRNAs identificados nas amostras do grupo câncer (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) foi avaliada nas amostras de sangue de 110 pacientes distribuídos em 28 voluntários saudáveis, 20 amostras de sangue de pacientes com pólipos hiperplásicos, 24 com adenoma, 20 com câncer colorretal inicial e 18 com câncer colorretal metastático.

Tabela 2. Identificação dos miRNAs utilizados nos ensaios de validação e sua sequência.

miRNA	ID	Número de acesso	Sequência do miRNA maduro
hsa-let-7e-5p	478579_mir	MI0000066	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-miR-106a-5p	478225_mir	MI0000113	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-28-3p	477999_mir	MI0000086	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA
hsa-miR-542-5p	478337_mir	MI0003686	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA
hsa-miR-423-5p	478090_mir	MI0001445	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU

Para normalização das amostras no momento da validação utilizamos o hsa-miR-423-5p, pois foi o candidato a endógeno mais estável de acordo com a análise realizada no programa GeNorm (selecionado entre os 262 miRNAs). O programa GeNorm gera uma tabela de valores que indicam a variabilidade de cada miRNA entre as amostras. O melhor miRNA para normalização possui a expressão mais

estável e constante. Após normalização, os dados gerados foram expressos como Delta CT e comparados através do *fold change*.

4.11 Predição *in silico* de genes regulados por miRNAs e as vias de sinalização envolvidas

Para predição *in silico* dos potenciais alvos dos miRNAs selecionados e avaliação das vias de sinalização as quais pertencem utilizamos a ferramenta miRWalk 3.0 (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), estabelecendo como critério interações preditas nos algoritmos selecionados que distinguem os grupos (miRWalk, miRanda e Targetscan). Os resultados da análise de predição foram posteriormente filtrados para os 5 mRNAs-alvo com maiores diferenças estatísticas (obedecendo um $p < 0,05$).

5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste *t* de *Student* não-pareado ou ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni quando apropriado. Significância estatística foi aceita para $p < 0,05$. Os programas utilizados foram o Graph pad Prism v. 6.0, BRB ArrayTools v. 4.4.0 e o SPSS v. 22. As análises foram demonstradas como médias geométricas de um intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Os dados clínico-demográficos foram expressos como frequências absoluta e percentual de cada variável, as quais foram cruzadas entre casos (câncer) e controle (não-câncer) por meio do teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. As variáveis que mostraram associação significativa com câncer colorretal ($p < 0,05$) foram submetidas à regressão logística multinomial e foram expressas as Odds Ratio ajustadas a seus respectivos intervalos de confiança 95%.

6. Resultados

6.1 Caracterização clínico demográfica dos pacientes

Inicialmente caracterizamos a população do estudo. Do total de 110 pacientes, 72 foram agrupados em um grupo denominado não câncer, que incluem os voluntários saudáveis, pacientes com pólipos hiperplásicos e pacientes com adenoma (65,4%) e 38 (34,54%) foram diagnosticados com câncer (CCRi e CCR com metástase), denominados grupo câncer. Dentre os pacientes com CCR, 18 (47,36%) apresentavam metástases.

Na população avaliada, 60,9% eram mulheres. A idade média dos pacientes foi de 59 ± 13 anos (26-92 anos), com a maior parte apresentando até 60 anos de idade (mediana). Adicionalmente, a maioria dos pacientes declarou-se como pardo (61,8%), residente na capital ou região metropolitana (73,6%) e não fumantes (68%).

Com relação à prevalência de CCR na população estudada, 55,3% eram mulheres, 57,4% apresentavam mais de 60 anos, se autodeclararam brancos (44,7%) e moravam na capital ou região metropolitana (60,5%). Nessa população 50% eram tabagistas e 50% faziam uso crônico de medicamentos. Dos pacientes que residem no interior do estado 53,6% foram diagnosticados com câncer. (tabela 3).

Dos pacientes incluídos no estudo, 61,3% relataram histórico familiar de câncer, e dentre as neoplasias indicadas, o câncer de pulmão foi a mais prevalente. Além disso, identificamos que a história familiar de câncer de pulmão ($p=0,015$), intestino ($p=0,038$) e ósseo ($p=0,017$) apresenta uma associação com pacientes com CCR quando comparados com o grupo não câncer (tabela 4).

Tabela 3. Avaliação clínico-demográfica da população de estudo.

	Total		Grupo			
			Não câncer		Câncer	
Sexo						
Feminino	67	60,9%	46	63,9%	21	55,3%
Masculino	43	39,1%	26	36,1%	17	44,7%
Idade						
Até 60 anos	61	55,5 %	45	62,5%	16	42,1%
> 60 anos	49	44,5%	27	37,5%	22	57,9%
Raça						
Branco	33	30%	16	22,2%	17	44,7%
Pardo	68	61,8%	52	72,2%	16	42,1%
Negro	9	8,2%	4	5,6%	5	13,2%
Moradia						
Capital e Região Metropolitana	82	73,6 %	59	81,9%	23	60,5%
Interior	28	26,4%	13	18,1%	15	39,5%
Fumante						
Não	68	61,8%	49	68%	19	50%
Ex	30	27,3%	17	23,6%	13	34,2%
Sim	12	10,9%	6	8,4 %	6	15,8%
Medicação						
Não	59	53,6%	40	55,5%	19	50%
Sim	51	46,4%	32	44,5%	19	50%

Tabela 4. Histórico familiar de câncer dos pacientes.

	Total		Grupo				p-Valor
			Não câncer		Câncer		
Histórico familiar de câncer							
Tipo de câncer							
CCR	9	8,1%	7	9,7%	2	5,1%	0,397
Pulmão	10	9,0%	3	4,2%	7	17,9%	*0,015
Útero	6	5,4%	4	5,6%	2	5,1%	0,924
Próstata	9	8,1%	6	8,3%	3	7,7%	0,906
Cabeça e pescoço	7	6,3%	6	8,3%	1	2,6%	0,233
Esôfago	2	1,8%	1	1,4%	1	2,6%	0,657
Intestino	7	6,3%	2	2,8%	5	12,8%	*0,038
Melanoma	8	7,2%	5	6,9%	3	7,7%	0,884
Hematológico	4	3,6%	1	1,4%	3	7,7%	0,089
Mama	9	8,1%	6	8,3%	3	7,7%	0,906
Ósseo	3	2,7%	0	0,0%	3	7,7%	*0,017
Fígado	3	2,7%	1	1,4%	2	5,1%	0,246
Ovário	1	0,9%	0	0,0%	1	2,6%	0,172
Tireoide	2	1,8%	2	2,8%	0	0,0%	0,294
Pâncreas	1	0,9%	1	1,4%	0	0,0%	0,460
Bexiga	1	0,9%	1	1,4%	0	0,0%	0,460
Rim	1	0,9%	1	1,4%	0	0,0%	0,460

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

6.2 Perfil de expressão diferencial de miRNAs

Caracterizada a população, inicialmente identificamos os miRNAs circulantes diferencialmente expressos. Para isso foi avaliada a expressão de 262 miRNAs em amostras de plasma de pacientes dos grupos controle-voluntário saudável, pólipó hiperplásico, adenoma, câncer colorretal inicial e câncer colorretal metastático (n=5 por grupo). Para caracterizar o perfil de expressão nos diferentes grupos, utilizamos uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, a fim de observar como as amostras se agrupam aleatoriamente por similaridade, e em seguida fizemos um agrupamento supervisionado distinguindo os diferentes grupos.

A figura 8A apresenta a expressão de miRNAs nos grupos organizados pelo consenso de subtipo hierárquico não supervisionado. A cor vermelha indica maiores níveis de expressão relativa, e a cor azul menor expressão. O dendograma no topo do mapa de calor (*heat map*) ilustra como as amostras de pacientes se agrupam por semelhança dos perfis de expressão de miRNAs, enquanto o dendograma à esquerda (eixo y) mostra o agrupamento dos microRNAs baseado no seu perfil de expressão entre as amostras dos pacientes. Analisando o resultado observamos no dendograma acima do *heat map* dois grupos distintos (Figura 8A). O grupo à direita é enriquecido com amostras dos grupos controle-voluntário saudável, pólipó hiperplásico e adenoma (não câncer – verde), enquanto que o grupo à esquerda é enriquecido com amostras do grupo CCRi e CCR metastático (câncer – laranja). Dessa forma, fizemos um segundo agrupamento hierárquico, agora supervisionado, dos miRNAs diferencialmente expressos no grupo Câncer (CCRi e CCR com metástase) vs. não câncer (voluntário saudável, pólipó hiperplásico e adenoma). Na análise de agrupamento supervisionado, observamos uma melhor distinção entre os grupos de estudo (Figura 8B).

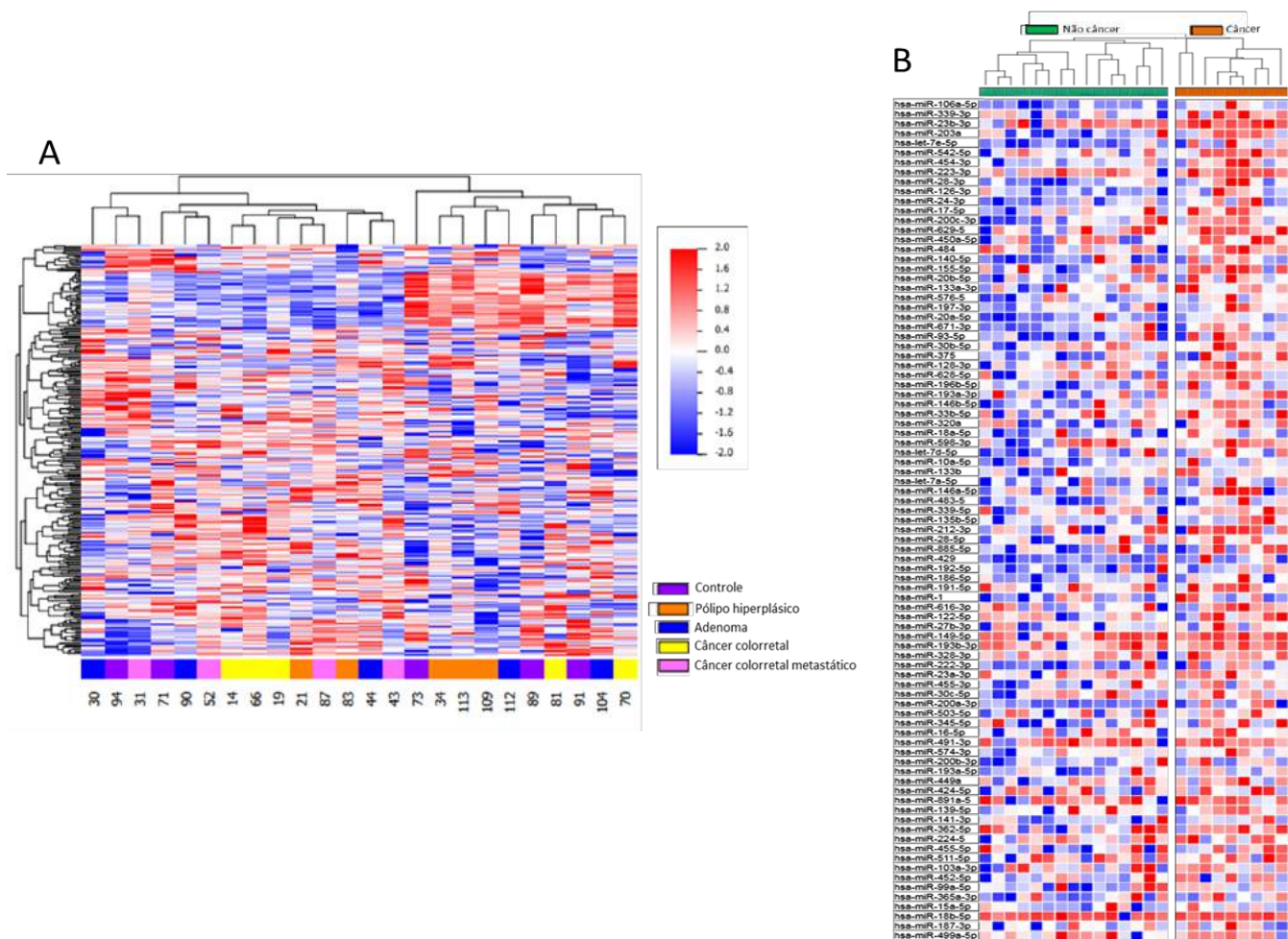


Figura 8. Análise hierárquica de *clusters* não supervisionado e supervisionado de miRNAs. A - O *heatmap* apresenta a expressão de miRNAs por agrupamento não supervisionado e B - expressão dos miRNAs por agrupamento supervisionado em formato de matriz, em que as linhas representam genes individuais e as colunas representam cada amostra de plasma dos pacientes.

6.3 Seleção dos miRNAs diferencialmente expressos

Dentre os miRNAs avaliados identificamos nove miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes do grupo câncer quando comparados com o grupo não câncer. Os resultados foram analisados com base no *fold change* e no valor de p , onde consideramos como superexpressão os miRNAs com um *Fold Change* (FC) maior ou igual a 1,5 e subexpressão abaixo ou igual a -1,5 com $p < 0,05$ (tabela 5).

Tabela 5. miRNAs diferencialmente expressos no grupo câncer vs. não câncer.

microRNA	P valor	FC
hsa-miR-383-5p	0.0452	-5.4
hsa-miR-190a-5p	0.0366	-1.8
hsa-miR-519a-3p	0.0330	-1.7
hsa-miR-106a-5p	0.0028	1.5
hsa-let-7e-5p	0.0114	1.6
hsa-miR-28-3p	0.0214	1.6
hsa-miR-454-3p	0.0153	1.7
hsa-miR-542-5p	0.0220	1.8
hsa-miR-203a	0.0157	2.0

A figura 9 mostra um novo agrupamento hierárquico supervisionado utilizando os nove miRNAs selecionados. Os miRNAs hsa-miR-542-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-454-3p e hsa-miR-203a, se apresentam superexpressos no grupo câncer, já os miRNAs hsa-miR-190a-5p, hsa-miR-383-5p e hsa-miR-519a-3p estão superexpressos no grupo não câncer.

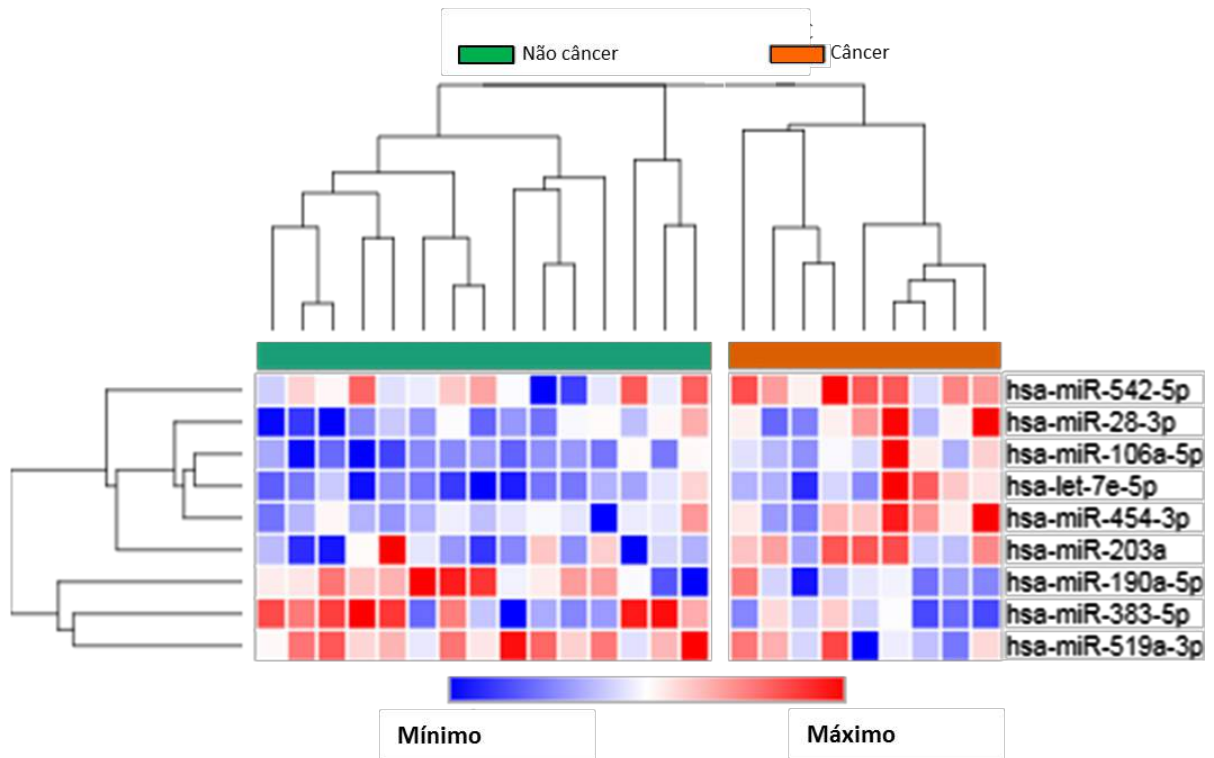


Figura 9. Heatmap com análise hierárquica de cluster supervisionado da expressão dos nove miRNAs mais diferencialmente expressos no grupo câncer vs. não câncer. Os dados de expressão são apresentados em formato de matriz, em que as linhas representam genes individuais e as colunas representam cada amostra de plasma dos pacientes.

6.4 Classificação dos miRNAs preditores de malignidade

Dentre os nove miRNAs encontrados aqueles com maior expressão nas amostras de pacientes com câncer foram analisados pelo potencial preditor de malignidade. Para isso utilizamos um classificador diagnóstico baseado no método *Linear Diagonal Discriminant Analysis* (DLDA) e *recursive elimination* (programa BRB) para combinação dos miRNAs com maior classificação (maior diferença entre os grupos). A melhor combinação foi obtida com o uso de quatro dos nove miRNAs (hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p), sendo possível distinguir 14/15 amostras de pacientes do grupo não câncer (93% especificidade) e 8/9 pacientes do grupo câncer (88,9% sensibilidade) [Figura 10]. Esse resultado sugere que os miRNAs apresentam potencial para distinguir pacientes com câncer de pacientes sem lesão maligna.

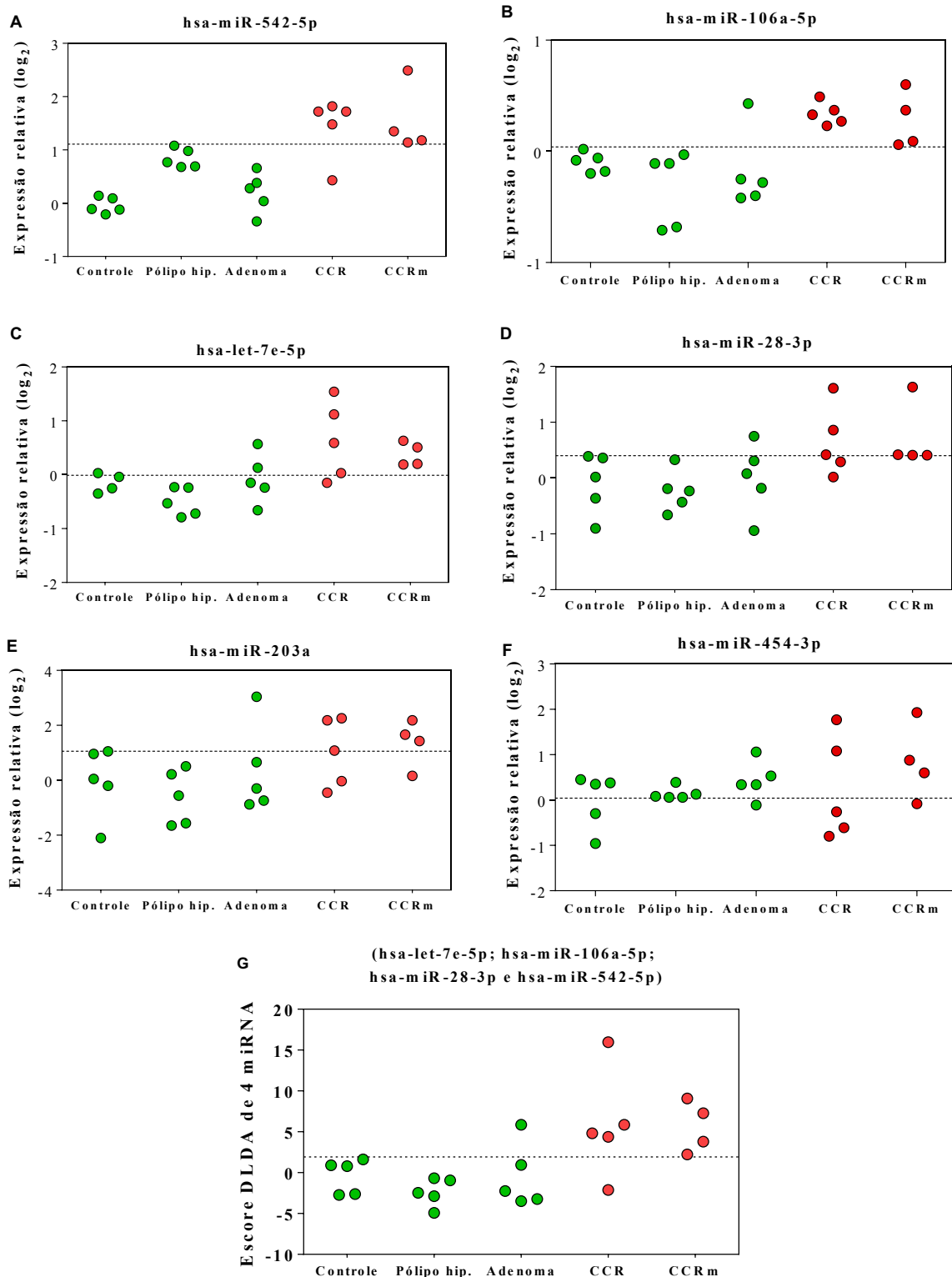


Figura 10. Classificação dos quatro miRNAs como preditores de malignidade. (A) A figura apresenta a expressão relativa dos miRNAs hsa-miR-542-5p, (B) hsa-miR106a-5p, (C) hsa-let-7e-5p, (D) hsa-miR-28-3p, (E) hsa-miR-454-3p e (F) e hsa-miR-203a, nos grupos câncer diferenciando-o do grupo não câncer. (G) Modelo preditivo de malignidade baseado na combinação dos miRNAs com maior sensibilidade e especificidade (hsa-miR-542-5p, hsa-miR106a-5p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-28-3p) pelo escore DLDA. A linha tracejada representa o limiar para considerar predição de maligno (acima da linha) e não maligno (abaixo da linha).

6.5 Validação dos miRNAs preditores de malignidade

Para validar esses achados, a expressão dos quatro miRNAs identificados nas amostras do grupo câncer (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) foi avaliada nas amostras de plasma de 110 pacientes distribuídos entre os grupos estudados. Nessas condições todos os miRNAs apresentaram-se diferencialmente expressos no grupo câncer quando comparados com o grupo não câncer (Figura 11).

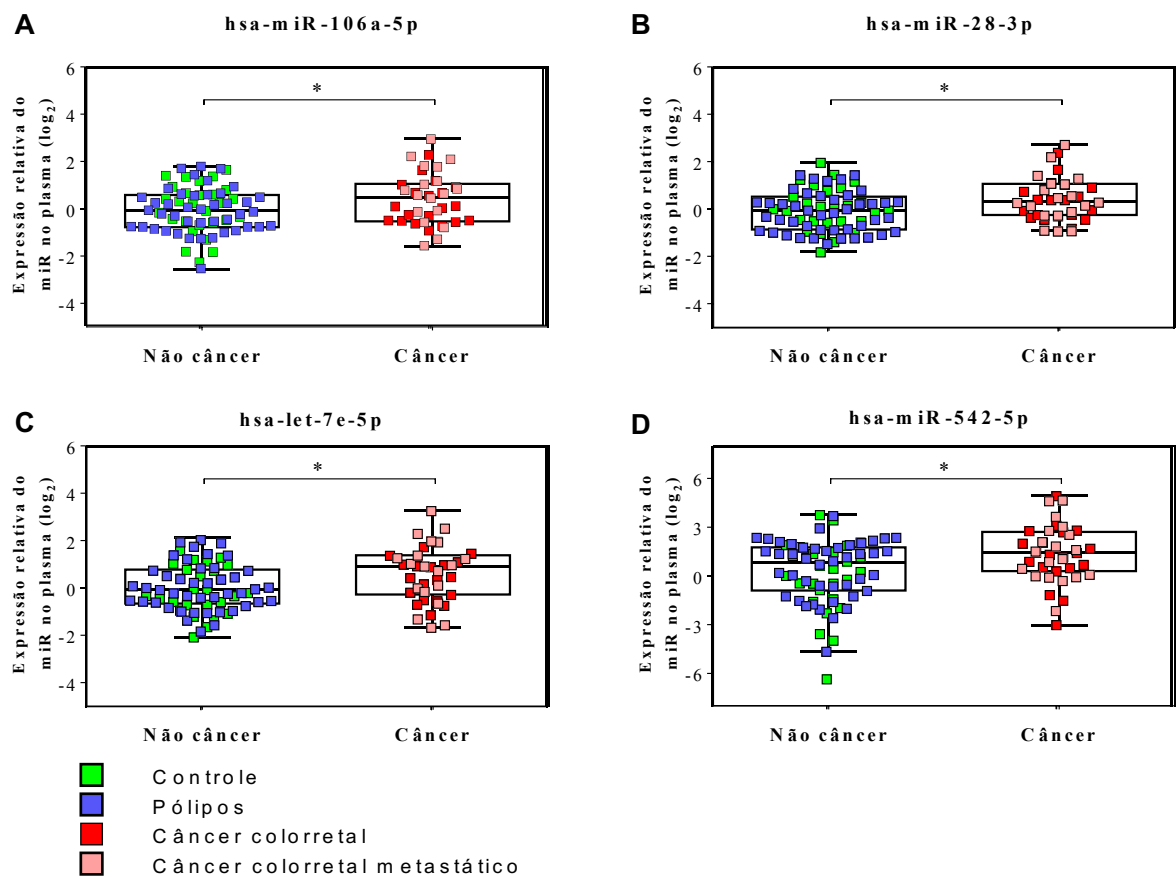


Figura 11. Expressão diferencial dos miRNAs hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-542-5p avaliados nos grupos câncer e não câncer. Expressão diferencial de miRNAs (A - hsa-miR-106a-5p, B - hsa-miR-28-3p, C - hsa-let-7e-5p e D - hsa-miR-542-5p). Teste U de Mann-Whitney, * $p < 0,05$.

6.6 Avaliação da expressão de miRNAs preditores de malignidade em amostras de pacientes com lesões benignas de malignas.

Uma vez identificados os miRNAs que diferenciam os grupos câncer de não câncer, verificamos se a expressão dos 4 miRNAs poderiam diferenciar os pacientes com lesões benignas, grupo pólipos (pólipo hiperplásico e adenoma), dos pacientes com lesão maligna, grupo câncer (câncer colorretal inicial e câncer colorretal metastático). Observamos na figura 12, que os miRNAs hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-542-5p estão diferencialmente expressos no grupo câncer quando comparados com o grupo pólipos e controle saudável (Figura 12).

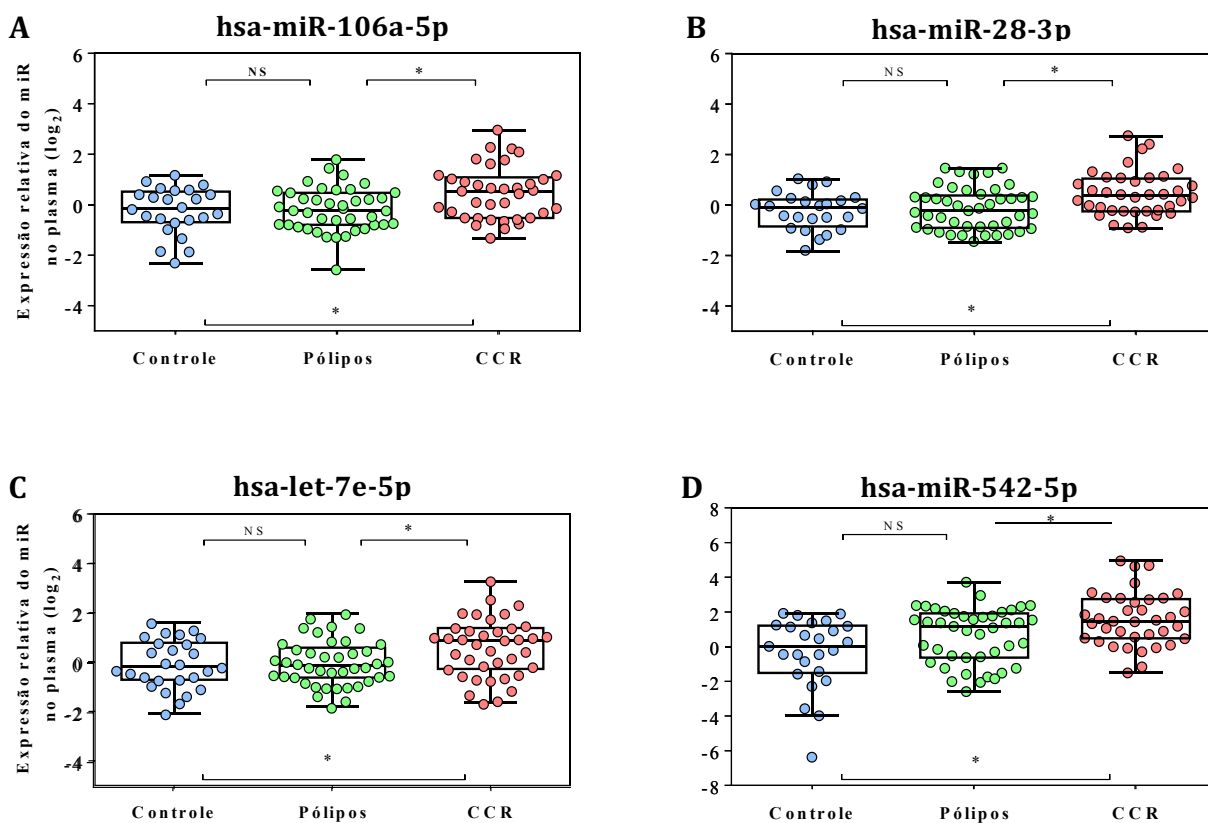


Figura 12. Os miRNAs hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-542-5p distinguem pacientes com câncer colorretal de pacientes com lesões benignas (pólipo hiperplásico e adenoma). Expressão diferencial de miRNAs (A - miRNAs hsa-miR-106a-5p, B - hsa-miR-28-3p, C - hsa-let-7e-5p e D - hsa-miR-542-5p). Foi utilizado ANOVA seguido de teste de Bonferroni e os resultados com diferença significativa estão indicados com * $p < 0,05$

6.7 Análise discriminante do potencial dos miRNAs como biomarcador diagnóstico de CCR

Após validação dos miRNAs foi realizada uma análise discriminante linear para avaliar o potencial dos miRNAs hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-542-5p como biomarcadores para distinguir pacientes com CCR daqueles que não apresentavam câncer. Para isso, valores de ΔCt obtidos por qRT-PCR foram incluídos como variáveis na análise de uma curva ROC para examinar a sensibilidade e especificidade desses miRNAs em diferenciar os grupos. Sabendo que o valor de uma curva ROC é 1 ou 100% e qualquer predição não aleatória seria superior a 0,5 ou 50%, obtivemos para cada miRNA os seguintes valores de AUC (\pm 95% CI), hsa-miR-106a-5p (0,6835 [0,5753 - 0,7917]) [Figura 13A]; hsa-miR-28-3p (0,7841 [0,6890 - 0,8793]) [Figura 13B]; hsa-let-7e-5p (0,6757 [0,5726 - 0,7788]) [Figura 13C] e hsa-miR-542-5p (0,7174 [0,6167 - 0,8181]) [Figura 13D]. De acordo com os dados os miRNAs hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p apresentaram isoladamente grande potencial como biomarcador plasmático de pacientes com câncer.

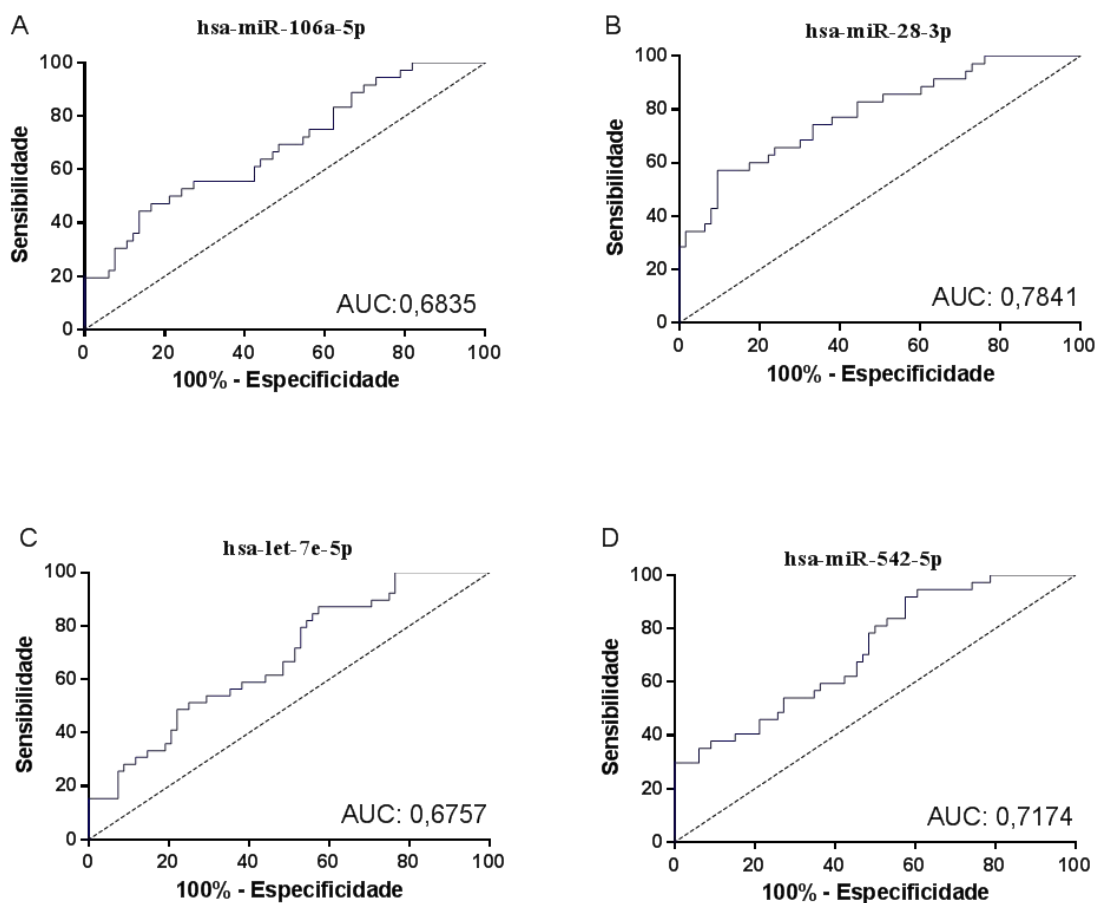


Figura 13. Curva ROC com os miRNAs expressos diferencialmente para avaliação da distinção entre os grupos câncer e não câncer. Qualquer predição não aleatória será superior a 0,5 ou 50%.

Ainda, fizemos uma avaliação da curva ROC com combinações entre os quatro miRNAs com o objetivo de encontrar uma assinatura de miRNAs com maior força discriminante entre os grupos. Os resultados mostraram que a combinação de miRNAs proporcionou um potencial discriminante significativo entre os grupos (hsa-miR-28-3p e hsa-let-7e-5p (AUC 0,7264 [0,6555 - 0,7974]) [Figura 14A]; hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106a-5p (AUC 0,7324 [0,6597 - 0,8051]) [Figura 14B]; e hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p (AUC 0,7363 [0,6670 - 0,8056]) [Figura 14C]. Também tivemos resultados positivos com as combinações: hsa-miR-106a-5p e hsa-let-7e-5p (AUC 0,6750 [0,6004 - 0,7496]) [Figura 14D]; hsa-miR-106a-5p e hsa-miR-542-5p (AUC 0,6953 [0,6221 - 0,7685]) [Figura 14E]; e hsa-miR-542-5p e hsa-let-7e-5p (AUC 0,6864 [0,6142 - 0,7586]) [Figura 14F]. Ainda foram avaliadas a associação de três e quatro miRNAs. A associação com maior potencial discriminante foi observada para

os seguintes painéis: hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p e hsa-miR-28-3p (AUC 0,7102 [0,6506 - 0,7697]) [Figura 14G] e hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p (AUC 0,7053 [0,6543 - 0,7564]) [Figura 14H]. Em conjunto, esses resultados indicam que os miRNAs plasmáticos (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-542-5p) apresentam potencial para serem utilizados como biomarcador diagnóstico de CCR isolados ou associados.

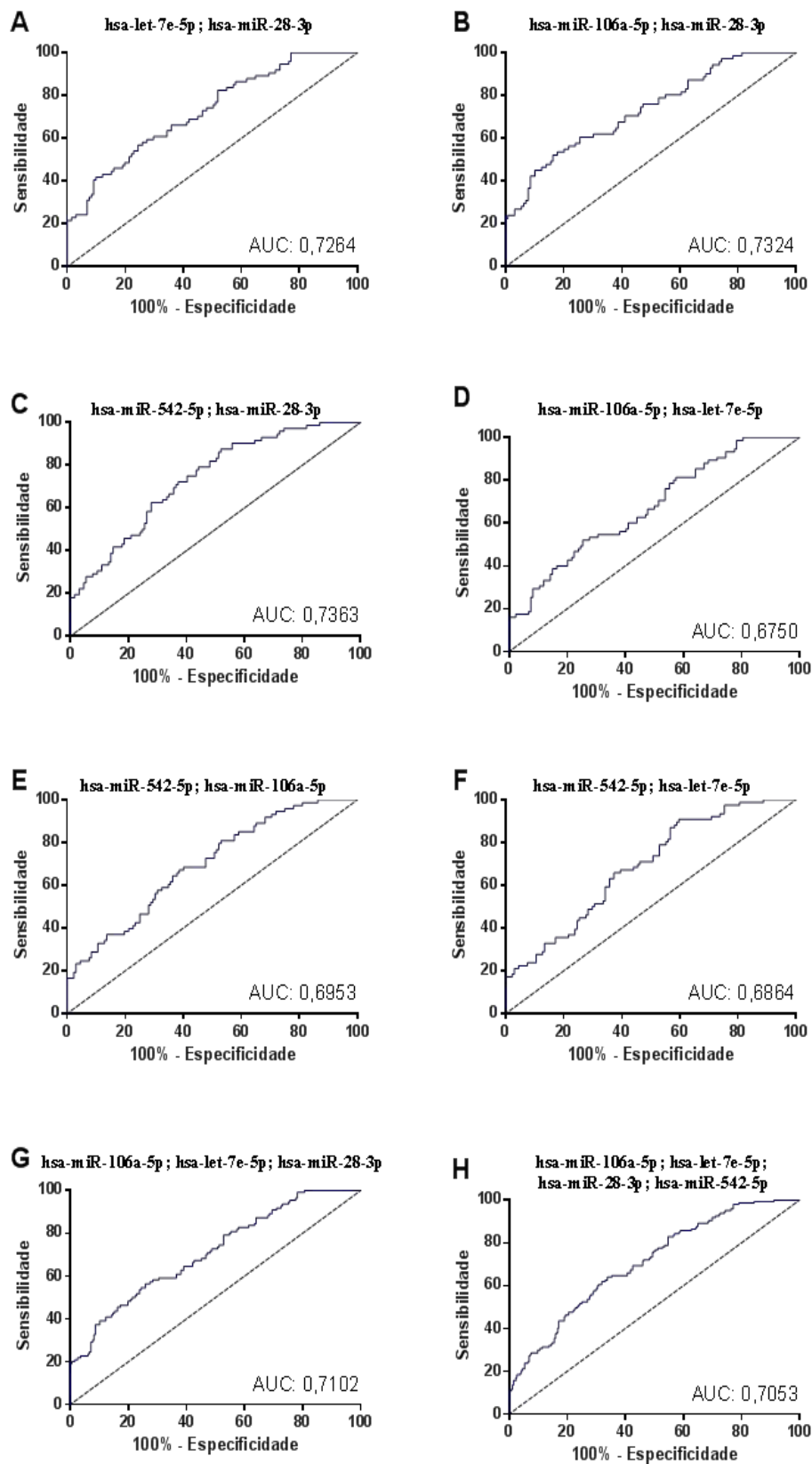


Figura 14. Curva ROC com associação de miRNAs expressos diferencialmente. Qualquer predição não aleatória seria superior a 0,5 ou 50%.

6.8 Predição de alvos e vias de enriquecimento reguladas pelos miRNAs *in silico*

Os miRNAs regulam inúmeros mRNAs-alvo que estão envolvidos em diversas vias de sinalização. Nesse contexto, é de grande importância identificar os alvos dos miRNAs estudados e a possível via de sinalização envolvida. Nesse sentido, fizemos uma predição *in silico* de alvos para identificar interações entre os miRNAs-mRNAs. Os miRNAs apresentaram uma grande rede de mRNAs possivelmente regulados. Os miRNAs hsa-let-7e-5p e hsa-miR-106a-5p apresentam uma maior interação entre a sua rede de alvos, seguida de interação com os alvos do hsa-miR-28-3p. Curiosamente, não foi identificada nenhuma interação entre os alvos do miRNA hsa-miR-542-5p com os alvos dos miRNAs hsa-let-7e-5p e hsa-miR-28-3p, mas há, mesmo que pequena, uma interação com o hsa-miR-106a-5p (Figura 15).

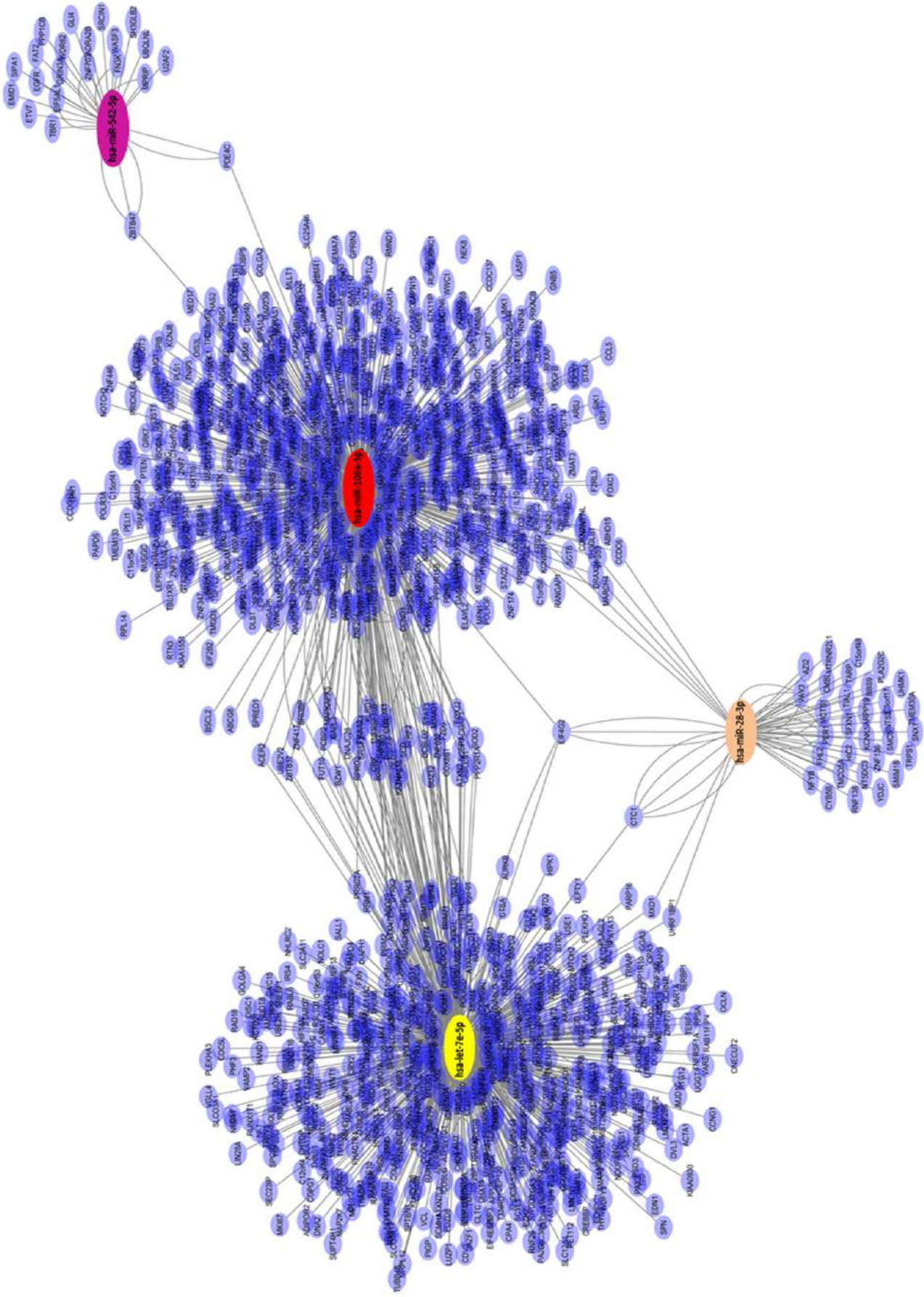


Figura 15. Rede de interação entre miRNAs e mRNAs. Os círculos centrais indicam os miRNAs e os círculos azuis são os alvos (mRNAs). O círculo amarelo indica o hsa-let-7e-5p, o hsa-miR-28-3p (rosa), hsa-miR-106a-5p (vermelho) e o hsa-miR-542-5p (violeta). A linha que conecta o miRNA ao mRNA indica regulação. O network é gerado usando a ferramenta miRWalk 3.0.

Após identificar os mRNAs regulados pelos miRNAs, buscamos as vias em que esses genes poderiam estar envolvidos. De forma interessante observamos que os alvos dos três miRNAs que compartilham maior rede de interação (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106a-5p) estão associados com assinaturas gênicas ligadas ao câncer colorretal. Além disso, identificamos que o hsa-miR-542-5p até o presente estudo não havia sido associado a vias de enriquecimento ligadas ao câncer colorretal, como pode ser observado na figura 16.

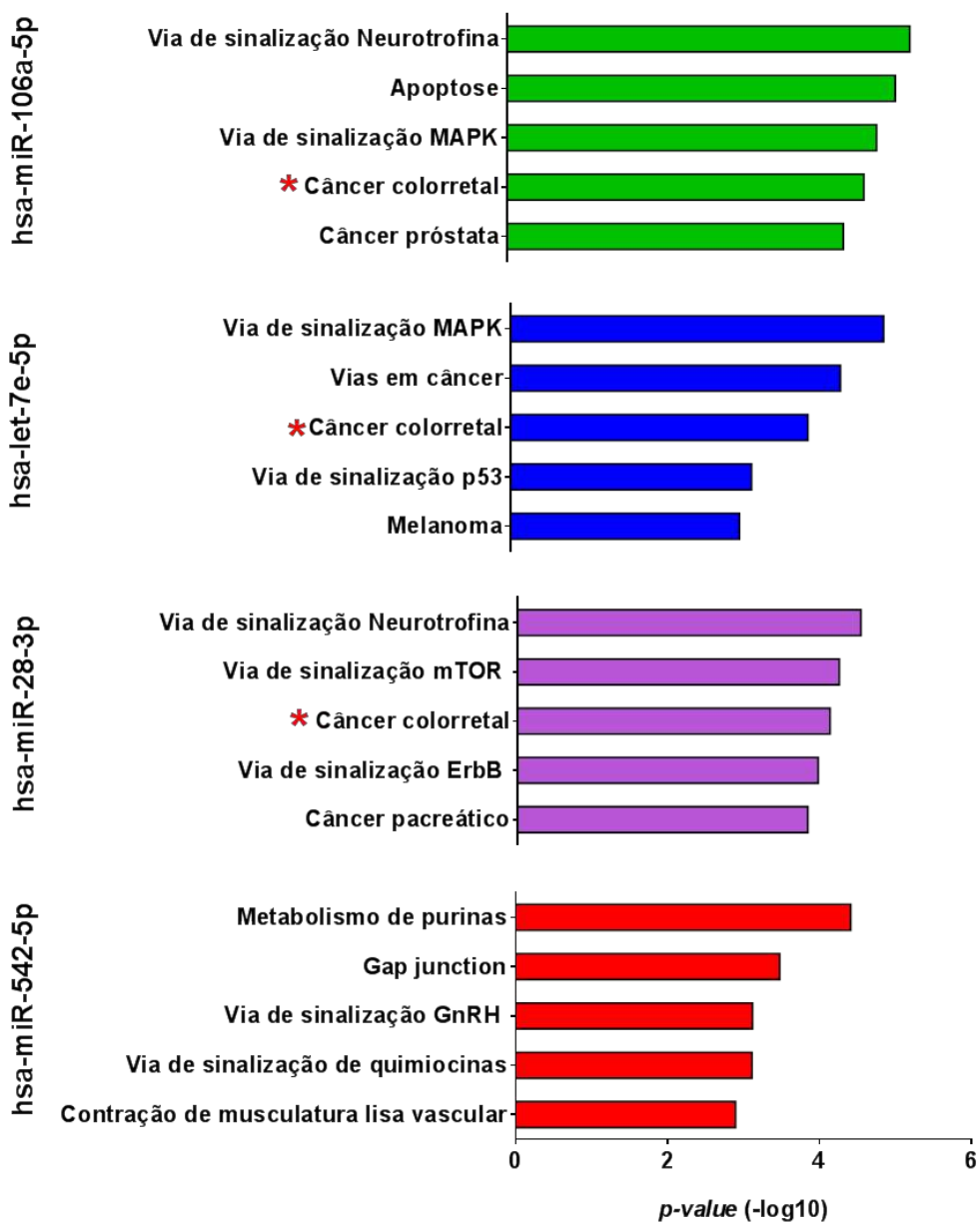


Figura 16. Análise de vias enriquecidas por mRNAs-alvo regulados pelos hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-106a-5p e hsa-miR-542-5p.

A análise das vias de enriquecimento a partir da associação dos 3 miRNAs com maior rede de interações (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106a-5p) confirmou a forte associação destes com as vias ligadas ao câncer (Figura 17).

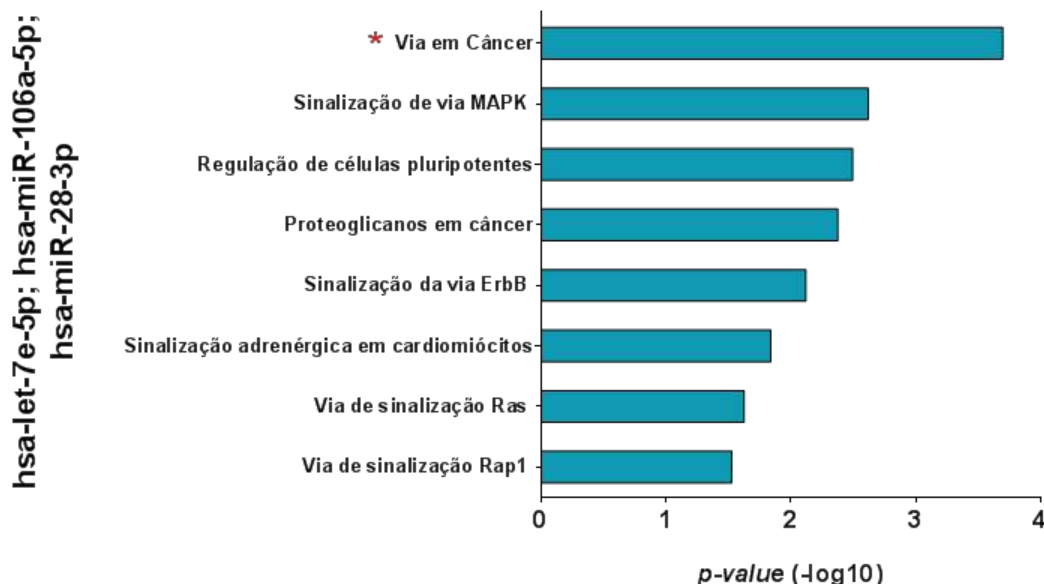


Figura 17. Vias de enriquecimento reguladas pela associação dos miRNAs hsa-let-7e-5p, hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106a-5p.

6.9 Associação da expressão de miRNAs

Na análise de predição de alvo *in silico* observamos uma maior rede de interação entre os miRNAs hsa-let-7e-5p e hsa-miR-106a-5p e estes com o hsa-miR-28-3p. Nesse sentido, fizemos uma avaliação estatística para estudar a força de associação entre esses miRNAs e observamos que, o hsa-miR-28-3p apresentou a maior força de associação com o hsa-miR-106a-5p ($p < 0,001$) e com o hsa-let-7e-5p ($p = 0,009$). Apenas o hsa-miR-542-5p não apresentou associação significativa com o hsa-miR-28-3p ($p = 0,061$) [tabela 6]. Corroborando com os dados *in silico*.

Tabela 6. Expressão dos miRNAs e possíveis associações.

	Total		hsa-miR-28-3p superexpressão				p-Valor
			Não		Sim		
hsa-miR-106a-5p superexpressão							
Não	98	89,1 %	97*	92,4%	1	20,0%	0,001
Sim	12	10,9%	8	7,6%	4*	80,0%	
hsa-let-7e-5p superexpressão							
Não	98	89,1%	97*	91,5%	1	25,0%	0,009
Sim	12	10,9%	9	8,5%	3*	75,0%	
hsa-miR-542-5p superexpressão							
Não	69	62,7%	69	65,1%	1	20,0%	0,061
Sim	41	37,3%	37	34,9%	4	80,0%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Em seguida, agrupamos todos os pacientes que apresentaram superexpressão nos grupos câncer vs. não câncer (FC>1,5) de hsa-miR-28-3p e hsa-let-7e-5p com hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106a-5p e observamos que a superexpressão dos miRNAs hsa-miR-28-3p e hsa-let-7e-5p está associado com o CCR (p=0,032) (tabela 7).

Tabela 7. Correlação entre a associação dos miRNAs com o grupo câncer.

	Grupo						p-Valor
	Total	Não câncer		Câncer			
hsa-miR-28-3p e hsa-let-7e-5p							
Não	96	87,3%	67*	93,1%	29	76,3%	0,032
Sim	14	12,7%	5	6,9%	9*	23,7%	
hsa-miR-28-3p e hsa-miR-106-5p							
Não	97	88,2%	66	91,7%	31	81,6%	0,133
Sim	13	11,6%	6	8,3%	7	18,4%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Por fim, fizemos uma análise em modelo de regressão linear multivariado. O modelo multivariado permite uma análise de correlação em toda a unidade amostral com eliminação das variáveis menos significativas a cada etapa apresentando ao final da análise a correlação com maior força de associação e o risco associado a este fator. Considerando os dados sócio demográficos e a expressão dos miRNAs como superexpressos ($FC \geq 1,5$) vs. normo/hipoexpressos ($1,5 < FC < -1,5$), analisamos todas as diferenças estatísticas que apresentaram associação ao grupo câncer em relação ao grupo não câncer. Nessa análise podemos observar quais das associações são fatores de confusão e qual o risco para o paciente que apresentá-la.

Dentre as análises avaliadas, observamos que o paciente apresentar histórico familiar de câncer de pulmão, intestino ou ósseo, não o predispõe a ter CCR. Enquanto que a superexpressão dos miRNAs (hsa-miR-28-3p ou hsa-let-7e-5p) se destacou como assinatura para o CCR com risco 4,51 vezes maior do paciente ser acometido com CCR (IC 95% = 1,05 – 19,33) [tabela 8]. Em conjunto esses dados reafirmam que especialmente os miRNAs hsa-miR-28-3p ou hsa-let-7e-5p apresentam significativo potencial para discriminar pacientes com CCR de pacientes saudáveis ou com lesões benignas.

Tabela 8. Modelo multivariado para o câncer.

	p-Valor	OR Ajustada	IC 95%	
CCR				
Histórico familiar de câncer de pulmão (Sim vs. Não)	0,076	3,98	0,86	18,36
Histórico familiar de câncer de intestino (Sim vs. Não)	0,149	3,83	0,62	23,80
Histórico familiar de câncer ósseo (Sim vs. Não)	1,000	5,96	0,59	15,97
hsa-miR-28-3p ou hsa-let-7e-5p (Superexpresso vs. Normo/hipoexpresso)	*0,043	4,51	1,05	19,33

*p<0,05, regressão logística multinomial; OR = Odds ratio; IC 95% = Intervalo de confiança 95% da OR Ajustada.

7. Discussão

Os miRNAs são uma grande promessa como potenciais biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e como alvo terapêutico no tratamento de pacientes com câncer (ZHU et al. 2017). Em grande parte, esse potencial está associado ao fato de muitos miRNAs derivados de tumores estarem presentes em fluidos corporais humanos, como o sangue, em uma forma altamente estável o que permite sua detecção de uma forma pouco invasiva (LI et al., 2015). Nesse sentido, no presente estudo apresentamos a identificação de um perfil de miRNAs presentes na circulação (hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-542-5p) capaz de distinguir pacientes com CCRi e CCR com metástase de pacientes sem câncer ou com lesões precursoras como o pólipó hiperplásico e o adenoma, apresentando potencial aplicação clínica para a triagem/diagnóstico de pacientes com CCR.

Embora tenhamos um alto número de estudos identificando miRNAs circulantes, as alterações na expressão de miRNAs podem ocorrer devido a comorbidades no momento do recrutamento e coleta da amostra, como outros tipos de câncer, diabetes e doenças intestinais hereditárias (TAYLOR et al., 2008; ASLAM et al., 2012). Nesse sentido, o presente estudo foi realizado a partir de uma seleção criteriosa de pacientes em todos os grupos. Os critérios de inclusão e exclusão foram selecionados a fim de reduzir possíveis alterações e aumentar a sensibilidade e precisão do estudo, excluindo dos grupos pacientes com diabetes, doenças intestinais hereditárias e outros tipos de câncer. Inicialmente, o recrutamento de voluntários que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão foi uma das dificuldades encontradas, uma vez que grande parte dos pacientes nos ambulatórios eram diabéticos. Outra dificuldade importante foi obter amostra de pacientes com câncer colorretal inicial e câncer colorretal metastático que ainda não haviam iniciado o tratamento, seja ele quimioterápico e/ou radioterápico, pois o tratamento pode induzir uma resposta inflamatória capaz de alterar os níveis de miRNAs circulantes (LYKOV et al., 2017).

Após o recrutamento dos pacientes, a análise dos dados de expressão gênica foi uma etapa essencial para obtenção de resultados confiáveis e para minimizar o impacto das variações entre as amostras. Nesse caso, a normalização foi realizada através da média geométrica da expressão global dos miRNAs estabelecidos dentro dos Cqs. De acordo com a literatura, a normalização através da média global estável é a melhor opção para o tratamento dos dados (VANDESOMPELE et. al., 2002;

TOIYAMA et al., 2013; YONG et al., 2013). Além disso, para otimizar a normalização, foram removidos os miRNAs com frequência de Cq 40 superior à 5% em todos os grupos, com o intuito de excluir os miRNAs com expressão muito baixa ou nula. Após a normalização dos dados foram identificados 262 miRNAs diferencialmente expressos e destes, 9 como preditores de malignidade dos quais 4 apresentaram alta expressão no grupo câncer (CCRi e CCR com metástase) [hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-542-5p] quando comparado com o grupo não câncer (voluntário saudável, pólipos hiperplásicos e adenoma).

No Brasil, apesar da existência de recomendações de rastreamento de CCR bem estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Coloproctologia e da atuação da ABRAPRECI (Associação Brasileira de Prevenção do Câncer de Intestino), (VALADÃO et al, 2010; ABRAPRECI, 2019), ainda não há um consenso em relação às questões práticas concernentes ao rastreamento de CCR na população, tais como: o financiamento, a eficácia, o alcance e a variabilidade dos resultados (WINAWER et al., 2011; NAYLOR et al., 2012; YEN et al., 2012; AVITAL et al., 2013). Para isso, medidas de conscientização da população quanto à existência, incidência e riscos do CCR devem ser realizadas, divulgando as medidas de prevenção, bem como a realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos e eficientes métodos de diagnóstico.

Em vários países estudados, o CCR tem apresentado um aumento de incidência, exceto nos EUA (ROSS, 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017), sendo que tal redução no número de casos tem sido relacionada com a intensificação do rastreamento de CCR no país desde meados da década de 1980 (BROWN & POTOWSKY, 1990; NELSON, PERSKY, TURKY, 1999; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). A estratificação do risco apresentado por cada paciente é importante para disponibilização dos recursos para rastreamento de forma adequada sem que haja tempo de espera suficiente para o desenvolvimento do tumor (ASSIS, 2011; TIWARI et al, 2012; AVITAL et al, 2013;). Apesar da importância do rastreamento para prevenção e diagnóstico precoce do CCR serem bem discutidas na área médica e na pesquisa, inúmeras dificuldades inerentes à realidade brasileira relacionadas às condições sócio-econômicas desfavoráveis, desconhecimento da população sobre o CCR, dificuldade ou falta de acesso ao sistema de saúde e longos períodos entre a consulta e o exame do paciente são

responsáveis pela redução na prevenção e atraso do diagnóstico e tratamento do CCR (ABRAPRECI, 2019).

Entre os métodos de rastreamento, a colonoscopia segue como melhor método para detecção de CCR, pois é capaz de diagnosticá-lo, tanto em fases avançadas como precoces (BRAY et al., 2017; LIANG & DOMINITZ, 2019). No entanto, mesmo com tantas vantagens clínicas, sob uma perspectiva de política de saúde pública, a ênfase na colonoscopia é problemática por algumas razões: os custos do procedimento são altos e o mesmo necessita de um aporte estrutural com equipamentos específicos e equipe médica especializada para condução do procedimento, além de anestesia (BRAY et al., 2017). Ainda, deve ser dada atenção a disponibilidade e qualidade dos recursos em cada região, uma vez que em municípios, distritos e na zona rural a disponibilidade do serviço de rastreamento é praticamente inexistente (FISHER; FIRKY; TROXEL, 2006; WINAWER et al., 2011). Evidenciando que essas regiões precisam de um serviço de rastreamento com menor custo e aporte estrutural para que se torne eficiente nas medidas de prevenção. Nesse sentido, o perfil de miRNAs com assinatura em câncer se apresentam como alternativa com excelente acurácia discriminante entre os grupos.

A partir da análise da expressão diferencial de miRNAs no sangue de pacientes demonstramos que um conjunto de miRNAs (hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p e hsa-miR-542-5p) presentes na circulação pode distinguir pacientes com CCRi e CCR com metástase de pacientes sem câncer ou com lesões precursoras como o pólipó hiperplásico e o adenoma. Esses resultados indicam um potencial para predição de malignidade através da expressão de miRNAs presentes em amostras de sangue, uma abordagem pouco invasiva e de fácil acesso.

Dentre os miRNAs encontrados no estudo, o hsa-miR-28-3p apresentou a maior força de discriminação entre os grupos de acordo com curva ROC e o modelo multivariado. O aumento da expressão deste miRNAs a nível plasmático já foi descrito em patologias como embolia pulmonar e retinopatia diabética, mas nunca para o câncer colorretal (ZHOU et al., 2016; LIANG et al., 2018). No entanto, a expressão diferencial do hsa-miR-28-3p foi demonstrada por Almeida et al., (2012) em linhagem de células de câncer colorretal (HCT116). Nesse estudo os autores observaram que a expressão do miR-28-3p aumentou a capacidade de migração e invasividade das células *in vitro*. *In vivo*, eles investigaram seu efeito na formação de

metástases à distância, a qual foi observada em vários tecidos sendo os mais frequentes em fígado e pulmão.

A alta expressão plasmática do hsa-miR-542-5p encontrada em pacientes com CCR em nosso estudo foi outro achado importante, pois ainda não havia sido publicada. Os resultados mostraram que esse miR apresenta uma alta força discriminante capaz de diferir amostras de pacientes com CCR de voluntários saudáveis e lesões benignas através da curva ROC apesar de não apresentar entre os seus possíveis genes já descritos no CCR ou vias envolvidas com o câncer. A alta expressão do miR-542-5p em pacientes com CCR também foi observada por Gaedcke et al., 2012, no entanto esse achado foi em tecido de pacientes. Nesse trabalho eles demonstram um painel de miRNAs superexpressos no CCR quando comparado com a mucosa normal. Em resumo, os autores conseguiram identificar 49 miRNAs expressos diferencialmente no grupo carcinoma colorretal. Desses, 13 foram validados, e entre os miRNAs se encontra o miR-542-5p.

O miR-542-5p também foi encontrado em outros tipos de câncer como o câncer de pulmão do tipo não pequenas células (JOERGER et al., 2014), carcinoma basocelular (SAND et al., 2012) e no osteossarcoma (CHENG et al., 2015). No câncer de pulmão do tipo não pequenas células avançado, a alta expressão do miR-542-5p plasmático atua como fator prognóstico para pacientes que receberam tratamento de primeira linha com bevacizumabe (anti-VEGF) e erlotinib (inibidor do EGFR) seguido de quimioterapia à base de platina (JOERGER et al., 2014). Ainda, de maneira similar aos nossos resultados no carcinoma basocelular, o hsa-miR-542-5p diferenciou o grupo câncer dos controles saudáveis. A avaliação dos dados revelou conexões do miRNA com vias promotoras de tumores que podem desempenhar um papel na patogênese molecular do carcinoma basocelular (SAND et al., 2012).

Diferente dos miRNAs 542-5p e 28-3p que foram relativamente pouco estudados, o hsa-let-7e-5p está descrito em diversas patologias, incluindo o câncer, mas como os outros miRNAs ainda não havia sido descrito em plasma de pacientes com câncer colorretal. A sua superexpressão já foi observada em tumores de pacientes com câncer de reto, mas não em cólon. *In vitro*, estudo em cultura de linhagem celular de câncer colorretal (Caco-2), mostrou que os níveis elevados do hsa-let-7e-5p resultaram no aumento da migração celular, enquanto a inibição da

expressão do hsa-let-7e-5p suprimiu significativamente a mobilidade das células tumorais, indicando um possível papel na indução de metástase (CHEN et al., 2018). Outro trabalho destacou a associação do hsa-let-7e-5p com o câncer colorretal usando uma análise de associação gênica e experimentos funcionais. Nesse estudo, Li et al., 2019 demonstraram uma interação funcional entre let-7e-5p, RAP1 (proteína de replicação 1 - que desempenha um papel importante no metabolismo do DNA), e a sensibilidade de células do câncer colorretal à oxaliplatina (quimioterápico utilizado para tratamento do CCR). A superexpressão do let-7e-5p e a interação com o RAP1 reduziram a sensibilidade à quimioterapia baseada em oxaliplatina, resultando em mau prognóstico para o paciente. Esses dados corroboram com os nossos resultados de análise das possíveis vias de sinalização envolvidas com hsa-let-7e-5p, pois também observamos um enriquecimento de genes alvos envolvidos com a sinalização RAP1 (LI et al., 2019).

Dentre os miRNA encontrados diferencialmente expressos no presente estudo o hsa-miR-106a-5p apresentou uma maior curva ROC quando associado a outros miRNAs. A expressão deste miRNA ainda não havia sido descrito em plasma de pacientes com câncer colorretal. No entanto, foi demonstrado em tecido de tumor obtido a partir de biopsias de CCR e que o miR-106a-5p é regulado negativamente pelo FER1L4 desempenhando um papel crucial na carcinogênese do CCR. Pacientes com baixa expressão de FER1L4 e alta expressão de miR-106a-5p apresentavam um pior prognóstico (YUE et al., 2015). Corroborando com nossos dados, em pacientes com câncer de pulmão do tipo não pequenas células o miR-106a-5p compõe um painel de miRNAs junto com o hsa-miR-20b-5p e hsa-miR-17-5p capaz de diferir pacientes com câncer de controles não afetados (LEIDINGER et al., 2015). Dentro das vias identificadas no nosso estudo reguladas pelo hsa-miR-106a-5p está a neurotrofina, que desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, mesmo após a vida adulta. Em outro estudo foi demonstrado que a redução da expressão do hsa-miR-106a-5p está associada ao desenvolvimento de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (CHEN et al., 2018). Ye e colaboradores (2014), identificaram uma relação positiva entre a expressão do hsa-miR-106a-5p e outros miRNAs hsa-miR-24-3p, hsa-miR-891a, hsa-miR-20a-5p e hsa-miR-1908 nos exossomas de soro de pacientes com carcinoma nasofaríngeo como mau prognóstico. Além disso, a

inibição desse painel de miRNAs regulou negativamente a via de sinalização MARK1 que altera a proliferação e diferenciação celular (YE et al., 2014). A expressão do miR-106a foi regulada positivamente em tecido de câncer de mama humano comparado ao tecido normal adjacente. Além disso, a superexpressão de miR-106a diminuiu significativamente a apoptose de células de câncer de mama e a sensibilidade à cisplatina. Ainda, regulou positivamente os níveis de Bcl-2 e negativamente a expressão de P53 (YOU et al., 2019). Corroborando com os nossos achados, dentre as vias possivelmente reguladas pelo miR-106a-5p, nós observamos *in silico* as mesmas vias de apoptose e CCR. Vale ainda ressaltar que o miR-106a também apresenta um papel em outras patologias além do câncer. Em outro estudo comparando a expressão de miRNAs em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hepatite B crônica e indivíduos saudáveis, foi demonstrado que os miRNAs hsa-miR-106a-5p e hsa-miR-520d-5p estavam altamente expressos e modulavam vias moleculares envolvidas na patogênese da hepatite B crônica (XING et al., 2014). Esse fato deve ser levado em consideração pois pode ser um fator limitante ao uso desse miRNAs de forma isolada como um biomarcador para o diagnóstico de CCR.

De fato, embora vários trabalhos na literatura abordem o uso de um miRNA como biomarcador, a especificidade dos biomarcadores baseados em um único miRNA é factível de erros como falsos negativo ou positivo. Portanto, a suspeita clínica aliada a uma triagem realizada por meio de coleta de sangue com combinação de múltiplos miRNAs séricos como os identificados no presente estudo (hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p e hsa-miR-542-5p) forneceria maior acurácia ao diagnóstico e possibilitaria prioridade no atendimento para rastreamento por intervenções endoscópicas em centros especializados. Adotar medidas como essa seria de suma importância para melhor adesão dos pacientes a triagem com redução da incidência e mortalidade dos pacientes possibilitando um melhor prognóstico com o início do tratamento ainda na fase de carcinogênese.

Em suma, foi estabelecido um painel de miRNAs plasmáticos único baseado em quatro miRNAs (hsa-miR-28-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p e hsa-miR-542-5p), com assinatura para o diagnóstico precoce do câncer colorretal de forma pouco invasiva. Além disso, identificamos que as possíveis vias reguladas por esses miRNAs estavam relacionadas ao desenvolvimento de câncer, regulação do ciclo

celular e apoptose. Dessa forma, acreditamos que estes dados sublinham o enorme potencial de miRNAs sanguíneos como uma ferramenta pouco invasiva para o diagnóstico precoce de CCR.

8. CONCLUSÃO

A assinatura de miRNAs séricos (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-28-3p, e hsa-miR-542-5p) apresenta-se como potencial biomarcador clinicamente aplicável para rastreamento/diagnóstico pouco invasivo de pacientes com CCR.

9. REFERÊNCIAS

ABRAPRECI. Associação Brasileira de Prevenção do Câncer de Intestino. A importância de rastrear o câncer colorretal, 2019.

AHMED FE, AHMED NC, VOS PW, BONNERUP C, ATKINS JN, CASEY M et al. Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in blood. **Cancer Genomics Proteomics** 9(4):179-92, 2012.

ALMEIDA MI; NICOLOSO MS; ZENG L; IVAN C; SPIZZO R; GAFÀ R et al. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. **Gastroenterology**. 142(4):886-896.e9, 2012.

ALQURASHI N; HASHIMI SM; ALOWAIDI F; IVANOVSKI S; WEI MQ. Dual mTOR/PI3K inhibitor NVP-BEZ235 arrests colorectal cancer cell growth and displays differential inhibition of 4E-BP1. **Oncol Rep** 40(2):1083-1092, 2018.

AMBROS V.; BARTEL B.; BARTEL D.P.; BURGE C.B et al. A uniform system for microRNA annotation. **RNA** 9(3):277-279, 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2018. Atlanta (GA): American Cancer Society; 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019. Atlanta: American Cancer Society; 2017.

ASLAM IM, PATEL M, SINGH B, JAMESON JS PRINGLE JH MicroRNA manipulation in colorectal cancer cells: from laboratory to clinical application **Journal of Translational Medicine** 10:128, 2012.

ASSIS, RVBF. Rastreamento e vigilância do câncer colorretal: Guidelines mundiais. **Gastroenterol Endosc Dig** 30(2):62-74, 2011.

ATKIN K. Ethnicity and the politics of the new genetics: principles and engagement. **Ethn Health Review**. 8(2):91-109, 2003.

AVITAL I, et al. Evidence-based guidelines for precision risk stratification-based screening (PRSBS) for colorectal cancer: lessons learned from the US Armed Forces: consensus and future directions. **J Cancer** 4(3):172-192, 2013.

BAGHERI F; MESRIAN TANHA H; MOJTABAVI NAEINI M; GHAEDI K; AZADEH M. Tumor-promoting function of single nucleotide polymorphism rs1836724 (C3388T) alters multiple potential legitimate microRNA binding sites at the 3'-untranslated region of ErbB4 in breast cancer. **Mol Med Rep. May** 13(5):4494-8, 2016.

BANERJEA A, CLARK S, DORUDI S. The changing face of familial colorectal cancer. **British Medical Journal** 330:2-3. 2005.

BECK D, ROBERTS P, SACLARIDES T, et al, editors. **The ASCRS textbook of colon and rectal surgery**. 2nd edition. New York: Springer Science Business Media, 2011.

BOND JH. Clinical evidence for the adenoma-carcinoma sequence, and the management of patients with colorectal adenomas. *Semin Gastrointest Dis* 11(4):176–84, 2000.

BRAY C, BELL LN, LIANG H, COLLINS D, YALE SH. Colorectal Cancer Screening. **WMJ**. 116(1):27-33, 2017.

BRENNER AT; DOUGHERTY M; REULAND DS. Colorectal Cancer Screening in Average Risk Patients. **Med Clin North Am**. 101(4):755-767, 2017.

BROWN ML, POTOSKY AL. The presidential effect: the public health response to media coverage about Ronald Reagan's colon cancer episode. **Public Opin Q** 54(3): 317-29, 1990.

BUCCAFUSCA G; PROSERPIO I; TRALONGO AC; RAMETTA GIULIANO S; TRALONGO P. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. **Crit Rev Oncol Hematol**. 136:20-30, 2019.

CHAN AT, GIOVANNUCCI EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(6):2029–43.e10, 2010.

CHANG L; CHANG M; CHANG HM; CHANG F. Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers **J Gastrointest Cancer** 48(4):305-313, 2017.

CHEN W; LIN G; YAO Y; CHEN J; SHUI H; YANG Q. et al., MicroRNA hsa-let-7e-5p as a potential prognosis marker for rectal carcinoma with liver metastases. **Oncol Lett**. 15(5):6913-6924, 2018.

CHEN X, BA Y, MA L, et al: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Res** 18(10):997–1006, 2008.

CHEN XQ; SAWA M; MOBLEY WC. Dysregulation of neurotrophin signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease and of Alzheimer disease in Down syndrome. **Free Radic Biol Med**. 114:52-61, 2018.

CHENG DD; YU T; HU T; YAO M; FAN CY; YANG QC. MiR-542-5p is a negative prognostic factor and promotes osteosarcoma tumorigenesis by targeting HUWE1. **Oncotarget**. 15;6(40):42761-72, 2015.

CHIAM K; WANG T; WATSON DI; MAYNE GC; IRVINE TS et al., Circulating Serum Exosomal miRNAs As Potential Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma. **J Gastrointest Surg**. 19(7):1208-15. doi: 10.1007/s11605-015-2829-9, 2015.

COLEMAN WB, TSONGALIS GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. **EXS**. Review (96):321-49, 2006.

CRISTOFARO M; CONTURSI A; D'AMORE S; MARTELLI N; SPAZIANTE AF; MOSCHETTA A; VILLANI G. Adenomatous polyposis coli (APC)-induced apoptosis of HT29 colorectal cancer cells depends on mitochondrial oxidative metabolism. **Biochim Biophys Acta**. 2015 Sep;1852(9):1719-28, 2015.

DAVILA RE; RAJAN E; BARON TH et al. ASGE guideline: colorectal cancer screening and surveillance. **Gastrointest Endosc** 63:546–557, 2006.

DAY DW, MORSON BC. The adenoma-carcinoma sequence. **Major Probl Pathol**. Review. 10:58-71, 1978.

DESVIGNES T; BATZEL P; BEREZIKOV E; EILBECK K; EPPIG JT; et al. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. **Trends Genet**. 31(11):613-626. 2015.

ESQUELA-KERSCHER A; SLACK FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**. Apr;6(4):259-69, 2006.

Estimativa 2019: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2018.

FARAZI TA; HOELL JI; MOROZOV P; TUSCHL T. **Adv Exp Med Biol**. 774:1-20. doi: 10.1007/978-94-007-5590-1_1; 2013.

FOUAD YA; AANEI C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**. 1;7(5):1016-1036, 2017.

FRANK, C., SUNDQUIST, J., YU, H., HEMMINKI, A. & HEMMINKI, K. Concordant and discordant familial cancer: familial risks, proportions and population impact. **Int. J. Cancer** 140, 1510–1516, 2017.

GARZON R, MARCUCCI G, CROCE CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nat Rev Drug Discov**. 9(10):775-89. 2010.

Global Cancer Observatory About colorectal Cancer. Atlanta, 2018.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 4;144(5):646-74, 2011.

HANAHAN; WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. Review. **Cell** Vol. 100, 57–70, January 7, 2000.

HINOUE T, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. **Genome Res** 22(2): 271-82, 2012.

HOFFMAN RM; ESPEY D, RHYNE RL. A public-health perspective on screening colonoscopy. **Expert Rev Anticancer Ther**. 11(4):561-9, 2011.

HUANG S; LV Z; GUO Y; LI L; ZHANG Y; ZHOU L et al. Identification of Blood Let-7e-5p as a Biomarker for Ischemic Stroke. **PLoS One**. 24;11(10):e0163951, 2016.

HUANG Z, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. **Int J Cancer** v.127, n. 1, p. 118-26, 2010.

IARC International Agency for Research on Cancer Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Press release n° 263 pg 1-3, 2018.

IORIO MV; CROCE CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Mol Med**. 4(3):143-59, 2012.

IRIZARRY RA, et al. The human colon cancer methyloma shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nat Genet** 41(2): 178-86, 2009.

JÄNNE PA; MAYER, RJ. Chemoprevention of colorectal cancer **The New England Journal of Medicine**. 342; 26, pg. 1960-68, 2000.

JOERGER M; BATY F; FRÜH M; DROEGE C; STAHEL RA. et al. Circulating microRNA profiling in patients with advanced non-squamous NSCLC receiving bevacizumab/erlotinib followed by platinum-based chemotherapy at progression (SAKK 19/05). **Lung Cancer**. 85(2):306-13, 2014.

JONAS S; IZAURRALDE E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nat Rev Genet**. Jul;16(7):421-33, 2016.

LARSSON SC, WOLK A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a metaanalysis of prospective studies. **Int J Cancer** 119(11):2657–64, 2006.

LEE RC; FEINBAUM RL; AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 75(5):843-54, 1993.

LEIDINGER P; BREFORT T; BACKES C; KRAPP M. High-throughput qRT-PCR validation of blood microRNAs in non-small cell lung cancer. **Oncotarget**. 26;7(4):4611-23, 2016.

LESLIE A.; CAREY FA.; PRATT NR et al. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. **Br J Surg** 89:845–60, 2002.

LI J; LIU Y; WANG C; DENG T; LIANG H; WANG Y; HUANG D; FAN Q; WANG X; NING T; LIU R; ZHANG CY; ZEN K; CHEN X; BA Y. Serum miRNA expression profile as a prognostic biomarker of stage II/III colorectal adenocarcinoma. **Scientific Reports** 5:12921, 2015.

LI L. et al. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. **Clin. Exp. Med.** 13, 109–117, 2013.

LI S; XU K; GU D; HE L; XIE L; CHEN Z et al. Genetic variants in RPA1 associated with the response to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer. **J Gastroenterol.** 28, 2019.

LIANG PS; DOMINITZ JA. Colorectal Cancer Screening: Is Colonoscopy the Best Option? **Med Clin North Am.** 103(1):111-123, 2019.

LIANG Z; GAO KP; WANG YX; LIU ZC3. RNA sequencing identified specific circulating miRNA biomarkers for early detection of diabetes retinopathy. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 1;315(3):E374-E385, 2018.

LIU SG, QIN XG, ZHAO BS, QI B, YAO WJ, WANG TY, LI HC, WU XN. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. **Oncol Lett.** 5(5):1639-1642, 2013.

LOZAR T; GERSAK K; CEMAZAR M; KUCHAR CG; JESENKO T. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. **Radiol Oncol.** 8. pii: /j/raon.ahead-of-print/raon-2019-0024/raon-2019-0024.xml. 2019.

LUO, X., BURWINKEL, B., TAO, S. & BRENNER, H. MicroRNA Signatures: Novel Biomarker for Colorectal Cancer? **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention** 20, 1272–1286, 2011.

LYKOV AP, KABAKOV AV, KAZAKOV OV, BONDARENKO NA, POVESHCHENKO OV, RAITER TV, POVESHCHENKO AF, STRUNKIN DN, KONENKOV VI. Levels of miRNA and Hormones in Thoracic Duct Lymph in Rats with Experimental Breast Cancer Induced by N-Methyl-N-Nitrosourea. **Bull Exp Biol Med.** 162(3):387-390, 2017.

MAIA MVAS et al. Preferência do paciente no rastreamento do câncer colorretal: uma comparação entre colonografia por tomografia computadorizada e colonoscopia. **Radiol Bras** 45(1):24-28, 2012.

MANNE U, SHANMUGAM C, BOVELL L, KATKOORI VR, BUMPERS HL. miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer. **Biomark Med** 4(5):761-70, 2010.

MCCALL MN; KIM MS; ADIL M; PATIL AH et al. Toward the human cellular microRNAome. **Genome Res.** 27(10):1769-1781. 2017.

MEOLA N.GENNARINO, V. A., AND BANFI, S. microRNAs and genetic diseases. **Pathogenetics.** 4;2(1):7, 2009.

MOKARRAM P, et al. Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer. **PLoS One** 4(9):e7012, 2009.

MOORE, J. S., & AULET, T. H. Colorectal Cancer Screening. *Surgical Clinics of North America*, 97(3), 487–502, 2017.

MORI Y, et al. Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray-based scanning. **Endocr Relat Cancer** 18(4): 465-78, 2011.

NAVARRO M; NICOLAS A, FERRANDEZ A; LANAS A. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. Review **World J Gastroenterol.** 28;23(20):3632-3642. 2017.

NAYLOR K, WARD J, POLITE BN. Interventions to improve care related to colorectal cancer among racial and ethnic minorities: a systematic review. **J Gen Intern Med** 27(8):1033-1046, 2012.

NEKLASON DW; SOLOMON CH; DALTON AL et al. Intron 4 mutation in APC gene results in splice and attenuated FAP phenotype. **Familial Cancer** 3:35-40, 2004.

NELSON RL, PERSKY V, TURYK M. Determination of factors responsible for the declining incidence of colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 42(6): 741-752, 1999.

NG EK, CHONG WW, JIN H, LAM EK, SHIN VY, POON TC, NG SS, SUNG JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 58(10): 1375-81, 2009.

OKADA N. et al. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev.* 28, 438–450, 2014.

PAN YJ; WEI LL; WU XJ; HUO FC; MOU J; PEI DS. MiR-106a-5p inhibits the cell migration and invasion of renal cell carcinoma through targeting PAK5. **Cell Death Dis.** 26;8(10):e3155, 2017.

PEREZ RO, et al. Instalação e resultados preliminares de programa de rastreamento populacional de câncer colorretal em município brasileiro. **ABCD Arq Bras Cir Dig** 21(1): 12-15, 2008.

RABENECK L, et al. Fecal immunochemical tests compared with guaiac fecal occult blood tests for population-based colorectal cancer screening. **Can J Gastroenterol** 26(3):131-47, 2012.

RAMANATHAN RK; HWANG JJ; ZAMBONI WC; SINICROPE FA; SAFRAN H; WONG MK et al., Low overexpression of HER-2/neu in advanced colorectal cancer limits the usefulness of trastuzumab (Herceptin) and irinotecan as therapy. A phase II trial. **Cancer Invest.** 22, 858–865, 2004.

ROSE J, AUGESTAD KM, COOPER GS. Colorectal cancer surveillance: what's new and what's next. **World J Gastroenterol.** Review. 28;20(8):1887-97, 2014.

ROSE J, AUGESTAD KM, KONG CY, MEROPOL NJ, KATTAN MW, HONG Q, AN X, COOPER GS. A simulation model of colorectal cancer surveillance and recurrence. **BMC Med Inform Decis Mak.** 8;14:29. 2014

ROSS JS; TORRES-MORA; WAGLE N, JENNINGS TA; JONES DM. Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer: current perspective. **Am J Clin Pathol.** 134(3):478-90, 2010.

RYAN BM, FAUPEL-BADGER JM. The hallmarks of premalignant conditions: a molecular basis for cancer prevention. **Semin Oncol.** 43(1):22-35. 2016.

RYAN BM, ROBLES AI, HARRIS CC. Genetic variation in microRNA network: the implications for cancer research. **Nat Rev Cancer** 10(6):389-402, 2010.

SAGAWA T, et al. Analysis of colonoscopic perforations at a local clinic and tertiary hospital. **World J Gastroenterol** 18(35):4898-4904, 2012.

SAND M, SKRYGAN M, SAND D, GEORGAS D, HAHN SA, GAMBICHLER T, ALTMAYER P, BECHARA FG. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma. **Br J Dermatol.** 167(4):847-55, 2012.

SARTORE-BIANCHI A; TRUSOLINO L; MARTINO C; BENCARDINO K; LONARDI S; BERGAMO F et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. **Lancet Oncol.** 17, 738–746, 2016.

SCHEPELER, T. et al., Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. **Cancer Res.** 68(15): p. 6416-24, 2008.

SCHETTER, A.J. et al., MicroRNA Expression Profiles Associated with Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma. **Tumor Biology.** 29: p. 19-19, 2012.

SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.** 62: 220–41. 2012.

SILVA FCC, et al. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **São Paulo Med J** 127(1): 46-51, 2009.

SIMMER F, et al. Comparative genome-wide DNA methylation analysis of colorectal tumor and matched normal tissues. **Epigenetics** 7(12):1355-67, 2012.

STIKSMA J; GROOTENDORST DC; VAN DER LINDEN PW. CA 19-9 As a Marker in Addition to CEA to Monitor Colorectal Cancer. **Clin Colorectal Cancer.** 13:239–44, 2014.

STRUBBERG, A. M., & MADISON, B. B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. **Disease Models & Mechanisms,** 10(3), 197–214, 2017.

TARANCÓN-DIEZ, M., BÜTTNER, R., & FRIEDRICH, N. Enhanced Tumoral MLH1-Expression in MLH1-/PMS2-Deficient Colon Cancer Is Indicative of Sporadic Colon Cancer and Not HNPCC. **Pathology & Oncology Research** 2019.

TAYLOR DD, GERCEL-TAYLOR C MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 110(1):13–21, 2008.

THIRUNAVUKARASU P; SUKUMAR S; SATHAIAH M; MAHAN M; PRAGATHEESHWAR KD; PINGPANK JF et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. **J Natl Cancer Inst.** 103:689–97, 2011.

TIWARI AK, et al. Surveillance for gastrointestinal malignancies. **World J Gastroenterol** 18(33): 4507-16, 2012.

TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, GOEL A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 455: 43–57, 2014.

TOIYAMA, Y. et al. Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. **J Natl Cancer Inst** 105, 849–859, 2013.

TOKARZ P, BLASIAK J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. **Acta Biochim Pol** 59(4): 467-74, 2012.

TOKUNAGA, R., SAKAMOTO, Y., NAKAGAWA, S., YOSHIDA, N., & BABA, H. The utility of tumor marker combination, including serum P53 antibody, in colorectal cancer treatment. **Surgery Today**, 47(5), 636–642, 2017.

USUBA W; URABE F; YAMAMOTO Y; MATSUZAKI J; SASAKI H; ICHIKAWA M et. al. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. **Cancer Sci.** 110(1):408-419, 2019.

VALADÃO M, LEAL RA, BARBOSA LC, CARNEIRO M, MUHARRE RJ. Perfil dos pacientes portadores de câncer colorretal operados em um hospital geral:

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 18;3(7), 2002.

VISHNOI A & RANI S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. **MicroRNA Profiling** 1–10 2017.

WEINBERG, R.A., The biology of cancer., New York, NY: **Garland Science.** 1 v. 12-30, 2007.

WEITZ J, KOCH M, DEBUS J, HOHLER T, GALLE PR, BUCHLER MW. Colorectal cancer. **Lancet** 365:153–165, 2005.

WINAWER SJ, ZAUBER AG. Incidence reduction following colonoscopic polypectomy. **Am J Gastroenterol.** 106(2):370, 2011.

WINAWER SJ. Screening of colorectal cancer. **Surg Oncol Clin N Am.** Review 14(4):699-722, 2005.

WU Y; SONG Y; XIONG Y; WANG X et al. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. **Cell Physiol Biochem.** 43(3):945-958, 2017.

XIAO YF, et al. microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: Novel tools for cancer screening (Review). **Oncol Rep** 30(2):535-44, 2013.

XING TJ, WANG B, ZHANG J. Screening and bioinformatic analysis of microRNA-associated immune clearance in patients with chronic hepatitis B. **Int J Clin Exp Med.** 15;7(12):4924-32, 2014.

YE SB, LI ZL, LUO DH, HUANG BJ, CHEN YS, ZHANG XS, CUI J, ZENG YX, LI J. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. **Oncotarget.** 30;5(14):5439-52, 2014.

YEN AW, LEUNG JW, LEUNG FW. A new method for screening and surveillance colonoscopy: Combined water-exchange and cap-assisted colonoscopy. **J Interv Gastroenterol** 2(3): 114-9, 2012.

YILMAZ ŞG; ERDAL ME; ÖZGE AA; SUNGUR. MA Can Peripheral MicroRNA Expression Data Serve as Epigenomic (Upstream) Biomarkers of Alzheimer's Disease? **OMICS.** 20(8):456-61, 2016.

YONG, F. L., LAW, C. W. & WANG, C. W. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer. **BMC Cancer** 13, 280, 2013.

YOU, F., LUAN, H., SUN, D., CUI, T., DING, P., TANG, H., & SUN, D. miRNA-106a Promotes Breast Cancer Cell Proliferation, Clonogenicity, Migration, and Invasion through Inhibiting Apoptosis and Chemosensitivity. **DNA and Cell Biology** 38; 2, 2019.

YUE B; SUN B; LIU C; ZHAO S; ZHANG D; YU F et al. Long non-coding RNA Fer-1-like protein 4 suppresses oncogenesis and exhibits prognostic value by associating with miR-106a-5p in colon cancer. **Cancer Sci** 106: 1323–1332, 2015.

ZAUBER AG; LANSDORP-VOGELAAR I; KNUDSEN AB; WILSCHUT J et al. Evaluating Test Strategies for Colorectal Cancer Screening: A Decision Analysis for the U.S. **Preventive Services Task Force Clinical Guidelines Annals of Internal Medicine** 149; 9, pg 659-669, 2008.

ZHOU X; WEN W; SHAN X; QIAN J. et al., MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of pulmonary embolism. **Thromb Res.** 2016 Feb;138:91-95, 2015.

ZHU M, HUANG Z, ZHU D, ZHOU X, SHAN X, QI LW, WU L, CHENG W, ZHU J, ZHANG L, ZHANG H, CHEN Y, ZHU W, WANG T, LIU P. A panel of microRNA signature in serum for colorectal cancer diagnosis. **Oncotarget**. 2017.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs PLASMÁTICOS E CÂNCER

Pesquisador: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 5

CAAE: 32361714.0.1001.5528

Instituição Proponente: Instituto do Cancer do Ceara

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.047.394

Apresentação do Projeto:

O câncer colorretal (CCR) é um dos tumores mais frequentes no mundo, superado apenas pelos tumores de pulmão, mama e próstata. No Brasil, o risco estimado para o CCR é de aproximadamente 16 casos/100.000 habitantes/ano, sendo o diagnóstico tardio uma ocorrência comum, o que ocasiona altas taxas de morbidade e mortalidade. O CCR é passível de prevenção e cura devido à longa progressão das lesões pré-cancerosas (adenomas) até o carcinoma metastático. O padrão ouro do diagnóstico e rastreamento são os testes endoscópicos, como colonoscopia e sigmoidoscopia, embora sejam procedimentos caros e invasivos, pouco utilizados na prática para o rastreamento da população de médio risco (indivíduos com mais de 50 anos, sem histórico familiar de CCR). Atualmente, o estudo de biomarcadores não invasivos tem sido foco de grande atenção, sendo o perfil de expressão de microRNAs circulantes um dos achados mais interessantes. Os microRNAs maduros (miRNAs) são moléculas de RNA de cadeia simples, contendo 20-23 nucleótidos de comprimento, capazes de regular negativamente uma série de genes pelo pareamento imperfeito com RNA mensageiro (RNAm). Portanto, tais moléculas tipicamente reduzem in vivo a estabilidade e a tradução de RNAm, culminando na regulação de genes que medeiam vários processos na tumorigênese, tais como a inflamação, a regulação do ciclo celular, resposta ao stress, diferenciação, apoptose e invasão. Tem sido demonstrado que a expressão de certos miRNA plasmáticos está relacionada

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@icc.org.br



Continuação do Parecer: 3.047.394

com o desenvolvimento e progressão do CCR, prestando-se portanto como possível biomarcador de rastreamento/prognóstico não invasivo. No presente projeto propomos a avaliação do perfil de expressão de miRNAs plasmáticos (miR-15b, -173p, -18a, 19a, -21, -29a, -92, -92a, -141, -221, -335, -601 e -760) em material biológico coletado de pacientes de quatro perfis principais (controles sadios, pacientes com adenomas, pacientes com CCR estádios iniciais e pacientes com CCR estádios avançados), atendidos em serviços de referência em endoscopia/proctologia ou em oncologia da região do Nordeste Brasileiro. Através de recrutamento e obtenção de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), será requerido dos pacientes o consentimento de guarda de amostras de sangue, e, quando cabível (ou seja, quando dispensável ao diagnóstico anátomo-patológico), também de tecido tumoral (fresco ou parafinado) e/ou de tecido sadio (fresco ou parafinado), além da autorização para consulta de informações contidas em prontuário como o histórico dos procedimentos médicos a que se submeteram (consultas médicas, exames endoscópicos, exames anátomopatológicos, etc.). Dessa forma, o presente projeto tem como intuito avaliar a expressão de miRNAs plasmáticos e/ou teciduais (em material fresco ou parafinado) quanto à sua capacidade de discriminar casos de CCR (iniciais ou avançados) de controles sadios ou de pacientes com adenomas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o perfil de expressão de miRNAs plasmáticos em pacientes que tiveram diagnóstico de câncer colorretal (CCR – inicial e avançado) em comparação com a expressão obtida a partir de amostras de controles sadios ou pacientes com adenomas (lesões pré-malignas).

Objetivos Secundários: Comparar, para fins de caracterização - em estudo prospectivo, a partir de amostras plasmáticas de pacientes com CCR e de pacientes com adenomas ou controles sadios, coletadas em Serviços de Referência do Estado do Ceará - o perfil de expressão de miRNAs plasmáticos (miR: -15b, -17-3p, -18a, 19a, -21, -29a, -92, -92a, -141, -221, -335, -601, -760) com achados dos exames endoscópicos para diagnóstico de CCR e adenomas (registros de prontuário referentes à colonoscopia e sigmoidoscopia) e estágio anatomopatológico das lesões (revisão de lâminas); comparar, para fins de avaliação de prognóstico, os perfis de expressão de miRNAs plasmáticos obtidos de amostras entre pacientes com CCR em estágios inicial e avançado; comparar, para fins de estudo custo-efetividade, o gasto para obtenção dos achados dos perfis de expressão de miRNAs plasmáticos (em CCR, adenomas e controles sadios) com os gastos relacionados aos procedimentos que se fizeram necessários para o diagnóstico dos pacientes (número de consultas, exames endoscópicos, biópsias, imunoistoquímicas, etc.).

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@icc.org.br



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos possíveis relacionados diretamente à participação no estudo referem-se à punção venosa, tais como dor local, hematoma ou extravasamento, e serão minimizados pela adoção de técnicas seguras e assépticas de coleta de material biológico. Quanto aos procedimentos cirúrgicos e endoscópicos, temos que nenhum desses procedimentos é indicado aleatoriamente, atendo-se, portanto, às situações em que existe risco ou certeza da doença estar presente ou como teste de rastreamento, conforme indicações preconizadas, descritas detalhadamente na introdução do presente projeto. A colonoscopia é um exame diagnóstico complexo, e também um procedimento cirúrgico, capaz de detectar o câncer de cólon e também de extirpar as lesões visíveis da mucosa. Portanto, é um procedimento que acarreta riscos, sendo que 1/1.000 procedimentos gera complicações como sangramentos e perfurações da parede intestinal. Ainda, há as questões da necessidade de anestesia e de pessoal qualificado, além do desconforto do preparo para o procedimento, ou seja, o esvaziamento intestinal por uso de laxantes. Portanto, tais procedimentos aos quais os pacientes se submeterão acarretam riscos, no entanto, o consentimento de guarda e uso do material biológico advindo desses procedimentos não acarreta em aumento nem sobreposição de risco. A aplicação de breve questionário (Checklist para avaliação de elegibilidade) sobre condições físicas que, porventura, possam alterar a expressão de microRNAs (processos inflamatórios, gripe/resfriado, diabetes, tuberculose) ocorrerá de forma breve e sucinta, a fim de não causar incômodo ao paciente.

Benefícios: Caracterização do perfil de expressão de microRNAs em uma população definida residente no Nordeste brasileiro, de forma a abranger dados relevantes e inéditos, com potencial de servir futuramente como uma ferramenta de rastreamento de câncer colorretal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pacientes (n=20, por grupo) serão recrutados conforme critérios de inclusão e exclusão, receberão informações sobre o estudo e serão convidados a participar, preenchendo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os critérios de inclusão e número amostral estimado seguem descritos no Item "Critérios de Inclusão". Após a obtenção do consentimento por escrito do paciente e agendamento da cirurgia ou colonoscopia, serão coletados até 20 mL de sangue em frascos de EDTA, antes do procedimento cirúrgico ou endoscópico. Tais amostras serão centrifugadas e criopreservadas com identificação que assegure sigilo da identidade dos consentidores.

Etapas de busca de expressão diferencial (screening por microarray, plataforma "Affymetrix" para

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@icc.org.br



Continuação do Parecer: 3.047.394

análise de microRNAs), validação (por técnica de RNASeq) e análise do perfil de expressão de microRNAs (plataforma de bioinformática) serão realizadas em parceria com o A.C. Camargo Cancer Center em São Paulo (Pesquisadora colaboradora: Dra. Sílvia Regina Rogatto). Quando o material tecidual for indispensável ao diagnóstico, segundo avaliação médica, poderá ser também coletado e criopreservado um diminuto

fragmento para análises futuras, caso o consentidor concorde (por escrito, em alínea do TCLE). Prontuário médico poderá ser consultado, também mediante consentimento escrito, para avaliações de custo-efetividade do método proposto.

Dois bancos de dados serão montados, um com dados clínicos disponíveis e outro do perfil de expressão de microRNAs, sendo que o perfil de expressão será analisado em plataforma de Bioinformática do A. C. Camargo Cancer Center (São Paulo-SP). Ao final, os dados obtidos serão correlacionados e confrontados com os dados de literatura disponíveis.

A evolução clínica dos sujeitos envolvidos (controles ou pacientes) será obtida pela revisão dos prontuários hospitalares, ou por entrevista em ambulatório, no momento da coleta de material biológico. Informações médicas e epidemiológicas dos pacientes recrutados somente serão avaliadas após obtenção do TCLE. Com relação aos desfechos secundários propostos no presente projeto, o Setor de Contas Médicas do Instituto do Câncer.

do Ceará poderá ser consultado para fornecer valores relacionadas ao custo do diagnóstico de CCR. Todos os dados serão acondicionados em planilha Excel de forma codificada, a fim de garantir o sigilo dos dados e o anonimato dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão presentes e cumprem adequadamente os princípios éticos, sendo uma pesquisa em andamento desde 2014. Trata-se o presente de uma Emenda tendo por justificativa adicionar novos assistentes da pesquisa: Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior (UFC) e Dra. Deysi e Viviana T. Wong (ICC).

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se a aprovação desta emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP acompanha o parecer do relator, aprovando o projeto sem quaisquer

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@icc.org.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 3.047.394

restrições.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1246741_E3.pdf	06/11/2018 22:09:28		Aceito
Outros	Adendo.jpg	21/11/2016 14:40:45	Camila Meirelles de Souza Silva	Aceito
Outros	Fiel depositário SAME-HUWC.pdf	24/02/2015 15:25:04		Aceito
Outros	Termo fiel depositário HUWC.pdf	24/02/2015 15:24:51		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Vínculo intuição coparticipante-carta de anuência.pdf	24/02/2015 15:24:33		Aceito
Outros	Fiel depositário SAME-HUWC.pdf	24/02/2015 15:14:43		Aceito
Outros	Termo fiel depositário HUWC.pdf	24/02/2015 15:14:17		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Vínculo intuição coparticipante-carta de anuência.pdf	24/02/2015 15:12:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Plataforma Brasil REBRATS microRNA NOVO 29SET14E.pdf	29/09/2014 15:13:40		Aceito
Outros	Checklist de Elegibilidade microRNAs 29set14E.pdf	29/09/2014 15:13:00		Aceito
Outros	TDFD - Dr. Ronaldo 2.jpg	06/08/2014 10:06:33		Aceito
Outros	TDFD - Dr. Ronaldo 1.jpg	06/08/2014 10:06:20		Aceito
Outros	TCLE do projeto com alterações.pdf	06/08/2014 10:04:41		Aceito
Outros	Modelo do Termo de Fiel Depositário do HGCC.doc	06/08/2014 10:02:26		Aceito
Outros	Termo de Fiel depositário.pdf	06/08/2014 10:01:53		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	vinculo pesquisa HGCC 28Jul14.pdf	28/07/2014 16:11:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE microRNAs ICCHGCC 28jul14C.pdf	28/07/2014 15:04:28		Aceito

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@icc.org.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 3.047.394

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Plataforma Brasil REBRATS microRNA 28jul14.pdf	28/07/2014 14:47:47		Aceito
Outros	Termo de Fiel Depositário 21Jul14.pdf	22/07/2014 18:20:22		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	vinculo instituicao participante 21jul14 SRRogatto.pdf	22/07/2014 18:19:19		Aceito
Folha de Rosto	Plataforma Brasil microRNAs.jpg	02/06/2014 16:20:49		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 29 de Novembro de 2018

Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@icc.org.br

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto de pesquisa: Avaliação do perfil de expressão diferencial de micrornas plasmáticos como ferramenta para o rastreamento de câncer colorretal
Órgão financiador e Número do Projeto: MCTI/CNPq/MS-SCTIE-Decit, 401176/2013-4.

Com o objetivo de obter novos conhecimentos sobre o câncer colorretal e algumas lesões benignas pré-cancerosas denominadas adenomas, o Instituto do Câncer do Ceará (ICC) em parceria com a Universidade Federal do Ceará (UFC) e o Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC), vem desenvolvendo uma pesquisa sobre possíveis marcadores plasmáticos importantes no diagnóstico, prognóstico e rastreamento dessas condições. Você foi ou está sendo admitido(a) em um serviço especializado para estabelecimento de um diagnóstico através de colonoscopia ou de tratamento cirúrgico, com a possível retirada de material biológico. Após o seu diagnóstico, o restante do material biológico retirado não utilizado é usualmente descartado conforme a legislação sanitária regulamentar sobre o assunto. Estamos convidando você a ceder a guarda de amostras de sangue e, em casos específicos definidos pelos médicos responsáveis, amostra tecidual residual fresca e/ou parafinada (coletado segundo normas de biossegurança) que não fará falta ao seu diagnóstico, nem implicará riscos adicionais ao seu procedimento ou tratamento, nem aumentará o seu tempo de procedimento diagnóstico ou cirurgia nem a sua permanência no Serviço pelo qual está sendo assistido(a). Os riscos potenciais referem-se à coleta de sangue (dor local, hematoma, extravasamento) e/ou aos procedimentos cirúrgicos e endoscópicos. A colonoscopia é um exame diagnóstico complexo e também um procedimento cirúrgico, capaz de retirar lesões suspeitas da mucosa intestinal. Sendo um procedimento invasivo, acarreta riscos (1 a cada 1.000 procedimentos pode gerar complicações como sangramentos ou perfuração da parede intestinal). Você está sendo admitido em um serviço referência no Estado do Ceará, sendo assistido por pessoal qualificado e o procedimento diagnóstico/cirúrgico somente ocorrerá a critério médico. Sua participação no estudo, portanto, não acarreta em aumento ou sobreposição de risco, exceto os riscos usuais do procedimento que somente será realizado se autorizado e após indicação médica. As amostras biológicas colhidas serão congeladas em tubos com códigos de barras (sangue ou tecido fresco) ou organizados em cassetes plásticos (tecido parafinado); e armazenadas de forma organizada, preservando o sigilo de sua identidade. A coleta, depósito, armazenamento e utilização serão gerenciados pelo Instituto do Câncer do Ceará-ICC, juntamente com a Universidade Federal do Ceará-UFC. Não haverá remuneração ou custos relacionados à sua participação, e nenhum gasto adicional decorrerá, sob nenhum pretexto, no caso de você aceitar participar do presente estudo. Através dessa pesquisa, poderemos avaliar se o perfil de expressão de certos reguladores, conhecidos como microRNAs plasmáticos, pode ser importante para o diagnóstico e/ou prognóstico do câncer colorretal. Sua participação poderá ocorrer nos seguintes grupos: como controle sadio, ou como portador(a) de lesões precursoras não malignas (adenomas) ou como paciente oncológico, a depender de critérios médicos pré-estabelecidos. Caso seu material venha a ser utilizado, você poderá ter acesso a qualquer informação sobre seu material biológico assim como sobre informações obtidas a partir do seu material biológico, e também sobre o teor e os resultados do estudo. As informações obtidas também poderão ser utilizadas em novas pesquisas. Informações adicionais como dados demográficos e clínicos serão acrescentadas para melhor estudo da condição apresentada; para isso, o seu prontuário médico poderá ser acessado, ficando asseguradas a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e o não preconceito. Suas informações não serão utilizadas em seu prejuízo. O acesso ao seu prontuário seguirá às normas estabelecidas pelas resoluções do Conselho Federal de Medicina e as instruções complementares do Conselho Regional de Medicina. Caberá ao médico patologista, após a cirurgia, avaliar se o seu material biológico pode ser alvo de estudo: caso não haja coleta de amostra tecidual, haverá a notificação no seu prontuário e a justificativa no seu termo de consentimento. As amostras ficarão mantidas em equipamentos especiais que garantem a conservação e a integridade das mesmas e estarão ordenadas por códigos de barras, não apresentando dados pessoais identificáveis, e não existindo quebra de privacidade ou de sua confidencialidade. As Instituições envolvidas no estudo asseguram que não haverá prejuízo para o seu diagnóstico, nem para o seu tratamento, nem quaisquer penalidades para o paciente que não queira consentir com a guarda de suas amostras para a pesquisa. Dúvidas em relação à inclusão de amostras poderão ser esclarecidas pelo coordenador do projeto ou pesquisadores participantes do mesmo. A qualquer momento, você poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material

biológico armazenado, bem como solicitar por escrito à Instituição de seu atendimento, sua devolução, sem quaisquer prejuízos ao seu diagnóstico / tratamento nas Instituições. Esclarecimentos adicionais sobre o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido poderão ser obtidos via telefones da Escola Cearense de Oncologia-ECO (3288-4653) ou do Comitê de Ética em Pesquisa, pelo telefone (3288-4653), ou diretamente no Hospital Haroldo Juaçaba/ICC, à Rua Papi Junior, 1.222. Este termo será assinado e rubricado em três vias idênticas, ficando uma com você, ou seu representante legal, outra arquivada no seu prontuário médico e uma terceira via será destinada ao arquivo do corpo gestor da pesquisa em questão, sob a responsabilidade do ICC. Somente assine este termo, se concordar, integralmente, com o seu teor.

CONSENTIMENTO

Tendo lido, atentamente todo o texto do presente termo, manifesto-me a respeito do mesmo, da seguinte forma:

CONCORDO NÃO CONCORDO que amostras de sangue podem ser coletadas, armazenadas e utilizadas na pesquisa intitulada "Avaliação do perfil de expressão diferencial de micrornas plasmáticos como ferramenta para o rastreamento de câncer colorretal "

CONCORDO NÃO CONCORDO que fragmentos de tecidos (quando não necessários para o meu diagnóstico) podem ser coletados, armazenados e utilizados na pesquisa supracitada.

CONCORDO NÃO CONCORDO que dados demográficos e clínicos contidos no meu prontuário médico, possam ser consultados e utilizados como fonte de informação na pesquisa supracitada, com a garantia institucional do sigilo e da confidencialidade dessas informações.

CONCORDO NÃO CONCORDO que além das informações mínimas citadas acima, meu prontuário médico possa ser acessado, para coleta de informações importantes à compreensão dos métodos diagnósticos utilizados, consultas e tratamentos, para fins de avaliação da viabilidade econômica da implantação de novos métodos não-invasivos de rastreamento do câncer colorretal ou lesões pré-cancerosas, com a garantia institucional do sigilo e da confidencialidade dessas informações.

Fortaleza, ____ de ____ de _____

Dados do Paciente:

Nome: _____

RG: _____ RG Hospitalar: _____

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordando com o teor.

Fortaleza _____ de _____ de _____

Dados do Responsável:

Nome: _____ RG: _____

Responsável pela coleta no Serviço: ICC; HUWC; ou HGCC

Fortaleza, _____ de _____ de _____

Assinatura: _____

Anexo 3
FICHA CLÍNICA

Número _____

Avaliação do perfil de expressão diferencial de micrnas plasmáticos como ferramenta para o rastreamento de câncer colorretal

Iniciais do nome: _____ Prontuário: _____
Data nasc.: ____/____/____ Idade: _____
Sexo: () feminino () masculino
Raça: () branca () afrodescendente () indígena () pardo
Escolaridade: () Fundamental incompleto () Fundamental completo () Médio incompleto () Médio completo () Superior incompleto () Superior completo
Data diagnóstico, se aplicável: _____
Local de nascimento: _____
Cidade de moradia: _____
Contato: _____

CARACTERÍSTICAS DO PACIENTE:

Diagnóstico câncer: () NÃO () SIM
Se sim, qual: () CÓLON ASCENDENTE () CÓLON DESCENDENTE () RETO

Histórico familiar:

() NÃO () SIM
Grau de parentesco: _____
Tipo de tumor: _____ Idade ao diagnóstico: _____
Status de sobrevida: _____
Grau de parentesco: _____
Tipo de tumor: _____ Idade ao diagnóstico: _____
Status de sobrevida: _____

CARACTERÍSTICAS DO TUMOR:

Estadiamento T_____ N_____ M_____ Se M1, local:

1.1 Fígado ()
1.2 Pulmão ()
1.3 Osso ()
1.4 Outro: _____

TRATAMENTO:

Cirurgia: () NÃO () SIM, Qual _____
Quimioterapia: () NÃO () SIM
Se QUIMIO: () NEOADJUVANTE () ADJUVANTE () PALIATIVA
Linhas _____

RADIOTERAPIA:

() NÃO () SIM

Drogas/Esquemas:

Toxicidade grau 3/4: () NÃO () Hematológica () Gastrointestinal () Cutânea
() Neurológica () Cardíaca
Hormonioterapia: () NÃO () SIM: _____
Terapia-alvo: () NÃO () Trastuzumab () Bevacizumab () Pertuzumab () ANTI-EGFR

HÁBITOS:

Fumante () NÃO () SIM Quantidade e frequência _____
Alergias: () NÃO () SIM _____
Uso de medicação: () NÃO () SIM _____
Visita de seguimento _____ DATA ____/____/____

Queixas clínicas:

Exame físico:

Exames complementares:

Recidiva/progressão: NÃO() SIM() Data: ____/____/____

Sítio: _____ Neoplasia maligna: NÃO() SIM() _____

Data do diagnóstico: ____/____/____

ANEXO 4 – Tabela com informações clínicas, sócio-demográficas e de expressão de miRNAs da coorte estudada.

ID	DIAGNÓSTICO	HOSPITAL	LOCAL	METASTASE	SEXO	IDADE	RAÇA
1	CCRM	ICC	RETO MÉDIO	HEPÁTICA	MASC	64	PARDA
2	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	36	PARDA
3	CCR	ICC	RETO INFERIOR	X	FEM	75	PARDA
4	CONTROLE	HUWC	X	X	MASC	35	BRANCA
5	CCRM	ICC	RETO MÉDIO	PULMONAR	MASC	74	AFRODESCENDENTE
6	CCR	ICC	RETO BAIXO MÉDIO	X	MASC	55	PARDA
7	CCR	ICC	RETO INFERIOR	X	FEM	83	AFRODESCENDENTE
8	CCR	ICC	COLON ASCENDENTE	X	FEM	92	BRANCA
9	CCRM	ICC	COLON ASCENDENTE	PULMONAR E HEPÁTICA	MASC	52	PARDA
10	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	63	PARDA
11	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	50	PARDA
12	CONTROLE	HUWC	X	X	MASC	42	PARDA
13	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	58	PARDA
14	CCR	ICC	X	X	MASC	37	PARDA
15	CCRM	ICC	COLON ASCENDENTE	HEPÁTICA	FEM	46	PARDA
16	CCRM	ICC	COLON ASCENDENTE	PULMONAR	FEM	67	PARDA
17	CCR	ICC	COLON DESCENDENTE	X	FEM	54	PARDA
18	CCR	ICC	RETO BAIXO	X	MASC	70	PARDA
19	CCR	ICC	X	X	MASC	72	BRANCA
20	CCR	ICC	RETO	X	FEM	26	BRANCA
21	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	RETO	X	FEM	40	PARDA
22	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	RETO	X	FEM	59	PARDA
23	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	RETO	X	FEM	68	BRANCA
24	CCR	ICC	RETO INFERIOR	X	MASC	55	BRANCA
25	CCR	ICC	RETO MÉDIO	X	FEM	63	PARDA
26	CCR	ICC	X	X	FEM	76	PARDA
27	CCRM	ICC	COLON	HEPÁTICA	FEM	47	BRANCA
28	CCRM	ICC	RETO SIGMOIDE	OSSO E SUPRARENAL	MASC	77	BRANCA
29	ADENOMA	HUWC	X	X	MASC	81	PARDA
30	ADENOMA	HGCC	RETO	X	MASC	55	PARDA
31	CCRM	ICC	COLON DESCENDENTE	PULMONAR E SUPRA RENAL ESQUERDA	FEM	72	PARDA
33	CCRM	ICC	RETO SIGMOIDE	HEPÁTICA E PERIANAL	MASC	75	PARDA

ID	DIAGNÓSTICO	HOSPITAL	LOCAL	METASTASE	SEXO	IDADE	RAÇA
34	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	COLÔNICO	X	MASC	48	PARDA
36	CCRM	ICC	RETO	PULMONAR	MASC	45	AFRODESCENDENTE
37	CCRM	ICC	RETO MÉDIO	PULMONAR	FEM	54	BRANCA
38	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	CECO	X	FEM	55	PARDA
39	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	X	X	MASC	63	PARDA
40	CCRM	ICC	RETO ALTO	ÓSSEO	MASC	69	BRANCA
41	CCRM	ICC	RETO	HEPÁTICA E PULMONAR	FEM	59	BRANCA
42	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	37	PARDA
44	ADENOMA	HGCC	RETO	X	FEM	73	AFRODESCENDENTE
45	CCR	ICC	RETO MÉDIO	X	MASC	58	PARDA
46	CCRM	ICC	RETO SIGMÓIDE	HEPÁTICA	FEM	61	BRANCA
47	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	70	PARDA
48	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	51	PARDA
49	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	59	PARDA
50	ADENOMA	HGCC	X	X	FEM	68	AFRODESCENDENTE
51	CCR	ICC	RETO SIGMÓIDE	X	MASC	60	BRANCA
54	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	40	PARDA
55	CCRM	ICC	RETO	PULMONAR	FEM	55	BRANCA
59	ADENOMA	HUWC	X	X	MASC	54	BRANCA
60	ADENOMA	HGCC	X	X	MASC	82	PARDA
62	ADENOMA	HGCC	X	X	MASC	67	PARDA
63	CCRM	ICC	RETO	ÓSSEA	MASC	65	PARDA
65	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	32	PARDA
66	CCR	ICC	RETO INFERIOR	X	MASC	69	AFRODESCENDENTE
67	CCRM	ICC	RETO	PULMÃO/HEPÁTICA	MASC	46	BRANCA
68	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	26	BRANCA
69	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	74	PARDA
70	CCR	HUWC	COLON ASCENDENTE	X	FEM	54	PARDA
71	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	44	PARDA
72	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	62	PARDA
73	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	49	BRANCA
74	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	MASC	55	PARDA

ID	DIAGNÓSTICO	HOSPITAL	LOCAL	METASTASE	SEXO	IDADE	RAÇA
75	ADENOMA	HUWC	X	X	FEM	55	BRANCA
76	CCR	ICC	SIGMÓIDE	X	FEM	57	PARDA
77	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	60	BRANCA
78	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	79	PARDA
79	ADENOMA	HUWC	X	X	MASC	59	BRANCA
80	ADENOMA	HUWC	X	X	FEM	68	PARDA
81	CCR	HUWC	X	X	FEM	62	BRANCA
82	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	39	PARDA
83	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	44	PARDA
84	CONTROLE	HUWC	X	X	MASC	67	BRANCA
85	CCR	ICC	X	X	FEM	62	BRANCA
86	CCR	ICC	X	X	FEM	68	BRANCA
87	CCRM	ICC	RETO BAIXO	FÍGADO	MASC	68	BRANCA
88	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	70	PARDA
89	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	33	BRANCA
90	ADENOMA	HGCC	RETO/TRANSVERSO	X	MASC	43	PARDA
91	CONTROLE	HGCC	X	X	FEM	36	PARDA
92	CONTROLE	HUWC	X	X	MASC	61	BRANCA
93	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	56	PARDA
94	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	55	PARDA
95	CONTROLE	HGCC	X	X	FEM	52	PARDA
96	CONTROLE	HUWC	X	X	FEM	47	BRANCA
97	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	50	PARDA
98	CONTROLE	HGCC	X	X	MASC	66	PARDA
99	CONTROLE	HGCC	X	X	MASC	65	PARDA
100	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	RETO	x	FEM	55	PARDA
101	ADENOMA	HGCC	RETO	X	MASC	66	PARDA
102	CONTROLE	HGCC	X	X	MASC	59	PARDA
103	ADENOMA	HUWC	RETO	X	FEM	59	PARDA
104	ADENOMA	HUWC	X	X	FEM	67	BRANCA
105	ADENOMA	HGCC	ASCENDENTE/RETO/SIGMÓIDE	X	MASC	79	PARDA
106	ADENOMA	HUWC	ASCENDENTE	X	FEM	59	BRANCA

ID	DIAGNÓSTICO	HOSPITAL	LOCAL	METASTASE	SEXO	IDADE	RAÇA
107	ADENOMA	HUWC	X	X	MASC	71	BRANCA
108	ADENOMA	HUWC	X	X	FEM	74	PARDA
109	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	X	X	FEM	49	PARDA
110	ADENOMA	HGCC	X	X	MASC	80	PARDA
111	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	MASC	55	PARDA
112	ADENOMA	HUWC	X	X	FEM	57	PARDA
113	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	MASC	46	BRANCA
114	ADENOMA	HGCC	X	X	FEM	89	PARDA
115	ADENOMA	HUWC	X	X	MASC	67	AFRODESCENDENTE
116	ADENOMA	HGCC	X	X	FEM	46	PARDA
117	ADENOMA	HGCC	COLON TRANSVERSO	X	MASC	75	PARDA
118	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	X	X	MASC	44	PARDA
119	CCRM	HGCC	RETO	HEPÁTICA E PULMONAR	FEM	67	AFRODESCENDENTE
120	POL.HIPERPLÁSICO	HUWC	X	X	FEM	60	PARDA
121	POL.HIPERPLÁSICO	HGCC	SIGMÓIDE E RETO	X	FEM	48	AFRODESCENDENTE

ANEXO 4 - Continuação

ID	HIST FAMILIAR	GRAU PARENTESCO	TIPO TUMOR	IDADE DIAG	SOBREVIDA	mir-106a-5p	mir-28-3p	let7e-5p	mir-542-5p
1	SIM	TIO	PROSTATA	X	X	-0,1493	0,1433	-1,6566	1,0662
2	NÃO	X	X	X	X	-0,1931	-0,9309	-0,3291	0,6606
3	NÃO	X	X	X	X	0,6667	1,0604	0,4780	0,2914
4	NÃO	X	X	X	X	-0,5546	-1,0292	0,3782	-0,2152
5	NÃO	X	X	X	X	-4,3502	1,4306	3,2756	1,5269
6	NÃO	X	X	X	X	-0,5249	-0,4307	-0,5020	0,5471
7	SIM	PRIMA/SOBRINHA	OVÁRIO / CCR	X	X	0,0920	0,3997	1,3781	-3,0186
8	SIM	PAI/FILHA	CCR/PULMÃO	X	X	1,6227	1,6875	1,1050	3,1141
9	SIM	PAI/IRMÃ	INTESTINO/MELANOMA	79/X	X	-1,3267	-0,9236	-1,5489	-0,0641
10	NÃO	X	X	X	X	-2,3085	-1,8115	-1,6377	-0,4515
11	NÃO	X	X	X	X	-1,8538	-1,2080	-0,6885	-1,5864
12	NÃO	X	X	X	X	-0,5067	0,0321	-0,3234	2,0854
13	NÃO	X	X	X	X	-1,8729	-1,3760	-1,0749	-3,9828
14	NÃO	X	X	X	X	-0,7599	-0,2845	-0,5475	0,4957
15	SIM	TIO/AVÓ	LEUCEMIA/INTESTINO	55/40	X	-0,8221	-0,2514	0,0077	-0,0870
16	SIM	TIA/TIA	INTESTINO/MAMA	70/50	X	1,8082	2,7326	2,5338	2,5617
17	SIM	PAI/TIA	PROSTATA/ÚTERO	60/55	X	-0,6590	-0,0288	0,9311	-1,1617
18	NÃO	X	X	X	X	-0,3245	-0,2101	1,7489	1,4290
19	NÃO	X	X	X	X	-0,9586	-0,9138	-0,1779	0,8816
20	SIM	SOBRINHA	LEUCEMIA	22	3 ANOS	0,0732	0,3995	0,4313	1,4669
21	SIM	AVÓ	ESTOMAGO	X	X	-1,2970	-0,6809	-0,5748	-1,2441
22	NÃO	X	X	X	X	-0,7966	-0,4328	0,0379	1,3691
23	SIM	MÃE	ESTÔMAGO	84	2 MESES	-0,2439	0,2251	-0,0264	1,5375
24	NÃO	X	X	X	X	0,8995	0,7536	0,9857	1,1826
25	SIM	TIA	ÚTERO	60	X	0,0123	0,5498	0,3507	2,7076
26	SIM	IRMÃ	ÚTERO	60	X	-0,5855	-0,2288	1,4690	4,9468
27	SIM	TIO/MÃE	PULMÃO/PULMÃO	70 / 70	X	-1,5949	-0,1057	1,2501	4,6768
28	SIM	IRMÃ/IRMÃO	MAMA/ÓSSEO	60 / 77	X	-0,1005	-0,8877	-1,3094	0,8781
29	SIM	IRMÃO	MELANOMA	63	X	-1,0380	-0,9443	-1,0256	-0,5273
30	SIM	PAI	X	79	40 DIAS	-2,5769	-1,2172	-0,2057	3,7161
31	NÃO	X	X	X	X	1,0215	1,0663	1,2844	3,0573
33	NÃO	X	X	X	X	2,0909	2,2176	0,9313	4,6277

ID	HIST FAMILIAR	GRAU PARENTESCO	TIPO TUMOR	IDADE DIAG	SOBREVIDA	mir-106a-5p	mir-28-3p	let7e-5p	mir-542-5p
34	NÃO	X	X	X	X	0,1482	0,8032	1,7682	2,1977
36	SIM	MÃE	PULMÃO	62	X	2,2171	1,3081	2,3119	-0,2918
37	NÃO	X	X	X	X	-0,6031	-0,9158	-0,6348	0,4629
38	NÃO	X	X	X	X	-1,2586	-1,2144	-0,8194	1,6972
39	NÃO	X	X	X	X	1,6957	0,6095	0,5259	-0,5805
40	SIM	MÃE/AVÓ	MAMA/CABEÇA E PESCOÇO	70 / 65	X	1,1576	0,2784	0,7447	2,1096
41	SIM	IRMÃO/PRIMA	ÓSSEO/HEPÁTICO	15 / 50	1ANO / 8 MESES	0,5642	0,1664	1,0432	0,0833
42	SIM	TIA/PRIMO(2ºGRAU)	CCR/CCR	50 / 41	1 ANO / 1 ANO	1,6329	1,2611	1,2021	3,4457
44	NÃO	X	X	X	X	0,0409	0,2383	0,7510	-0,6284
45	SIM	IRMÃ/PRIMO	PULMÃO/PULMÃO	60 / 67	1 ANO /6M	0,5377	0,4141	-0,2809	1,3308
46	SIM	PAI/TIO	FÍGADO/LEUCEMIA	65 / 55	3 MESES /1ANO	0,6249	0,4910	0,9902	1,8328
47	SIM	TIO	PROSTATA	50	X	-0,4740	-0,6941	-0,2194	-2,5967
48	SIM	MÃE/PRIMA	MAMA/MAMA	76 / 84	NS/10 ANOS	-0,6175	-0,8711	-0,9677	-4,6642
49	SIM	PAI/MAE/IRMÃ	PROSTATA/PULMAO/PULMAO	72/X/54	6 MESES	1,1847	1,2766	1,4062	1,3645
50	NÃO	X	X	X	X	0,4796	0,5720	0,3797	-2,0613
51	NÃO	X	X	X	X	1,1625	1,1265	1,0026	2,7873
54	SIM	MÃE	PULMAO	40	8 ANOS	0,5611	0,1589	-0,5838	-0,4547
55	NÃO	X	X	X	X	0,4292	0,5669	1,9586	-0,0061
59	SIM	MÃE	MAMA	77	2 ANOS	-0,9554	-0,8980	-0,3576	1,7408
60	NÃO	X	X	X	X	0,1836	-0,2401	-1,5557	2,3310
62	NÃO	X	X	X	X	-0,2377	-1,0932	0,4705	2,1129
63	SIM	IRMÃO / IRMÃO	INTESTINO / ÓSSEO	31 / 38	2 / 1 ANO	0,8228	-0,2511	-0,1390	2,8017
65	SIM	TIO	FÍGADO	58	1 MÊS	1,1621	1,1906	1,3028	1,4898
66	NÃO	X	X	X	X	2,2742	2,3981	1,9690	2,0172
67	SIM	TIO	MELANOMA	60	6ANOS	0,7745	0,2942	0,1273	-2,1476
68	SIM	TIO	CABEÇA E PESCOÇO	49	6MESES	0,2857	-0,0374	1,0000	-0,8637
69	NÃO	X	X	X	X	-1,0935	-1,2220	-1,0319	-1,8476
70	SIM	PAI/TIO	PULMÃO/PROSTATA	80 / 60	X	-0,2883	-0,3384	-0,7413	2,0858
71	SIM	AVÔ/TIA	PANCREAS/PANCREAS	60 / 70	4MESES/1ANO	0,4013	0,0157	0,4096	1,1315
72	SIM	IRMA/PRIMA	MAMA/UTERO	58/ 60	13 / 2ANOS	0,3974	0,2888	1,0457	-3,5740
73	SIM	PAI/AVÓ	PROSTATA/LEUCEMIA	70 /70	4ANOS / 5 ANOS	0,2244	0,9093	1,5866	-6,3741
74	SIM	MAE/TIO	MAMA/PROSTATA	48/ 70	8ANOS/4 MESES	0,5849	0,3200	0,4021	1,7685

ID	HIST FAMILIAR	GRAU PARENTESCO	TIPO TUMOR	IDADE DIAG	SOBREVIDA	mir-106a-5p	mir-28-3p	let7e-5p	mir-542-5p
75	SIM	IRMÃO	MELANOMA	50	4 MESES	-0,5551	-1,1793	-1,8124	1,3736
76	SIM	TIA/TIO	INTESTINO/PROSTATA	48/ 60	1 /8 ANOS	-0,5262	-0,4186	-1,1403	0,6984
77	SIM	TIA/TIO	MAMA/MELANOMA	X	X	-0,7237	-0,4936	-0,5782	1,8082
78	NÃO	X	X	X	X	-0,9850	-0,4874	-2,0774	-0,4554
79	SIM	PAI/TIO	INTESTINO/INTESTINO	50 /70	6MESES/6MESES	-1,2817	-1,2020	-1,3554	-2,0158
80	SIM	PRIMA/TIA	CCR/TCR	55/ 70	X	0,2099	0,2793	0,7563	0,7087
81	NÃO	X	X	X	X	0,6575	0,9275	0,8915	2,8282
82	NÃO	X	X	X	X	0,9195	1,4709	1,1424	3,7747
83	NÃO	X	X	X	X	-0,7470	-0,4290	-0,3092	-0,1580
84	SIM	MAE/TIA	INTESTINO/INTESTINO	78/ 60	2 ANOS/ 2 ANOS	-1,3487	-0,9898	0,7810	-2,2893
85	SIM	MAE/IRMAO	MELANOMA/PULMAO	60/ 59	4 / 6 MESES	1,0055	-0,0565	0,1687	-1,5155
86	SIM	IRMAO/IRMA	ESOFAGO/ESOFAGO	36/ 60	3 / 6 MESES	-0,5368	-0,8144	-0,6948	1,6943
87	SIM	TIO	PULMÃO	X	X	1,7748	0,8224	1,9944	1,6126
88	SIM	PAI	MELANOMA	70	6 MESES	0,5814	0,7948	-0,0678	1,9136
89	SIM	TIA	MAMA	70	X	1,3849	1,9820	2,1254	-1,9600
90	NÃO	X	X	X	X	0,4704	1,4532	1,3942	2,9532
91	SIM	IRMÃ	CCR	40	4ANOS	0,7830	-0,4365	-0,7173	0,2585
92	SIM	MAE/TIA	TIREOIDE/ESTOMAGO	70/ 75	2/ 3-4 ANOS	-0,4501	-0,1484	-0,0316	-1,4329
93	NÃO	X	X	X	X	-0,6106	-0,5565	-1,3537	0,4577
94	SIM	IRMÃ	TIREOIDE	45	5ANOS	-0,1060	0,2605	-0,9367	0,0202
95	SIM	PAI/MAE	CCR/UTERO	48/ 40	1ANO / 2ANOS	-0,3668	0,5538	-1,1996	1,2459
96	SIM	TIA/AVÓ MATERNA	CCR/UTERO	68/ 78	4/ 6 ANOS	1,3416	1,0281	0,7442	1,8880
97	NÃO	X	X	X	X	0,9247	1,2112	2,0536	1,0898
98	SIM	IRMA	BEXIGA	66	1 ANO	0,6438	-0,0562	0,5152	1,1776
99	SIM	PRIMO	CCR	X	X	1,3543	0,1176	-0,1984	1,3739
100	SIM	TIA/AVÔ	CCR/ESTOMAGO	60 / 75	1ANO/1ANO	0,5404	0,3015	-0,3888	1,9164
101	NÃO	X	X	X	X	0,6086	-0,5079	0,2284	1,5557
102	NÃO	X	X	X	X	0,2072	-0,5031	-0,4349	0,9085
103	NÃO	X	X	X	X	0,2670	-0,8379	-0,5893	-1,5249
104	SIM	PAI	ESOFAGO	75	5 ANOS	0,2302	-0,0357	-1,0023	-0,3039
105	SIM	TIO/PRIMO	GARGANTA/GARGANTA	X	2 ANOS/ 2 ANOS	2,5095	1,3067	0,8580	-1,5996
106	SIM	IRMÃO	GARGANTA	46	4 ANOS	0,8505	0,8789	1,9582	2,3111

ID	HIST FAMILIAR	GRAU PARENTESCO	TIPO TUMOR	IDADE DIAG	SOBREVIDA	mir-106a-5p	mir-28-3p	let7e-5p	mir-542-5p
107	NÃO	X	X	X	X	1,7874	0,2864	-0,5254	1,1680
108	SIM	TIO/TIO	BOCA/ESTOMAGO	45/ 50	6 / 6 MESES	-0,3193	0,6904	0,0941	1,9920
109	SIM	MAE/AVÓ	BOCA/ESTOMAGO	61/X	1 ANO / 1 ANO	1,7017	-0,3486	0,2407	0,9203
110	SIM	IRMÃ/IRMÃO	ESTOMAGO/PROSTATA	70/ 50	5 ANOS/ 5 ANOS	1,4429	1,4539	1,9177	2,0474
111	SIM	PAI/TIO	ESTOMAGO/ESTOMAGO	80/ 82	8MESES/1 ANO	-0,8828	-1,0679	-0,5045	1,4176
112	SIM	PAI/TIA	GARGANTA/PULMÃO	80/ 40	6/ 6 MESES	-0,7878	-0,9691	-0,1927	0,2029
113	SIM	AVÔ	PROSTATA	83	3 ANOS	-0,0340	0,4180	1,2361	2,3667
114	SIM	IRMÃ	X	50	X	-0,5562	0,0142	-0,5476	2,3654
115	NÃO	X	X	X	X	-0,8000	-0,3040	-0,9495	-1,7396
116	NÃO	X	X	X	X	0,6451	-1,4592	-0,7396	0,0704
117	SIM	IRMAO	RIM	X	6 MESES	-0,1516	-0,1425	-0,0639	1,5440
118	SIM	NÃO	X	X	X	-0,9658	-0,8595	0,8699	-1,2473
119	NÃO	X	X	X	X	2,9620	1,0972	1,3986	3,6746
120	SIM	IRMA	UTERO	40	1 ANO	-0,0835	0,1471	1,4632	0,0504
121	SIM	MAE/TIO	ESTOMAGO/ESTOMAGO	75 / 60	6 MESES	-0,7809	0,2291	0,0251	-0,9077