

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

CRISTIANE RIOS PETRARCA

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM AMOSTRAS TUMORAIS E LINFONODAIS DE
CÂNCER COLORRETAL**

Porto Alegre
2016

CRISTIANE RIOS PETRARCA

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM AMOSTRAS TUMORAIS E LINFONODAIS DE
CÂNCER COLORRETAL**

Tese para postular o Título de Doutora em Medicina e Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva
Co-orientadora: Dra. Rosângela Vieira de Andrade

Porto Alegre
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P493e

Petrarca, Cristiane Rios

Expressão de microRNAs em amostras tumorais e linfonodais de
câncer colorretal / Cristiane Rios Petrarca. – Porto Alegre, 2016.
102 f. : il. tab.

Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde - Faculdade de
Medicina, PUCRS).

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Co-orientadora: Dra. Rosângela Vieira de Andrade.

1. Medicina. 2. Biologia Molecular. 3. Neoplasias Colorretais.
4. RNA. I. Silva, Vinicius Duval da. II. Andrade, Rosângela Vieira de.
III. Título.

CDD 616.994347

CDU 616.35-006

NLM WI 529

**Ficha Catalográfica elaborada por Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

Dedico este trabalho aos que tem ou tiveram suas
vidas cruzadas pelo câncer.

O convívio diário com esta doença, tão desafiador
quanto cruel, possibilita-me conhecer pessoas que
ensinam coragem, resiliência e o real valor das
coisas, das pessoas e dos saberes.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr Vinícius Duval da Silva pelos ensinamentos, pela confiança e principalmente por ter aceitado orientar este trabalho.

A Prof^a. Dra Rosângela Vieira de Andrade pela orientação à distância, por ter me recebido no Laboratório de Biotecnologia da UCB com a difícil missão de apresentar a mim o estudo dos RNAs.

Ao Dr Bernardo Garicochea por estimular a estudar microRNAs.

Ao Prof. Dr Samuel Dumith por seus ensinamentos e sua dedicação no tratamento estatístico com os dados deste estudo.

As pessoas que, em algum momento, foram indispensáveis para o andamento e finalização deste trabalho: Silvana Lunardi Alves, Gisele Carvalho, Verusca Najara, Giquitibá Mora de Melo (Gique) e Rodrigo Rovere.

Aos colegas que assistiram meus pacientes nos meus períodos de ausência para conclusão deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação Ernesto Carlos Amaral da Silva e José Thiago Comunelo pela disponibilidade em esclarecer dúvidas e facilitar os trâmites administrativos.

As minhas filhas Sofia e Luisa por colorirem minha vida.

Ao meu esposo Esteban Kiss por apoiar este projeto e dividir as tarefas do dia a dia. Por ter aceitado ler textos, ouvir explicações e assistir apresentações mesmo sendo de outra área de interesse.

Aos meus pais Luiz Fernando Teixeira Petrarca (in memoriam) e minha mãe Luci Rios Petrarca pelos ensinamentos através do exemplo de vida. Por entenderem que sonhos podem se tornar realidade e acreditarem na minha capacidade de ir além das expectativas.

As avós Luci Rios Petrarca e Eva Kiss pelo apoio recebido e por serem cuidadoras insubstituíveis nos meus períodos de ausência. Ao meu sogro Francisco José Kiss pelo apoio recebido e o constante estímulo ao conhecimento.

Muito obrigada a todos que, de alguma forma, ouviram e opinaram sobre este projeto. Todos influenciaram no seu resultado final.

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!

Mario Quintana

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres no mundo. Apresenta etiopatogenia multifatorial, heterogênea e complexa, ainda não totalmente elucidada. A evolução da doença é muitas vezes distinta do exaustivo estadiamento cirúrgico e patológico, eventualmente pacientes com doença localizada evoluem com padrão agressivo apresentando mal prognóstico. Evidências recentes demonstram a heterogeneidade molecular do câncer colorretal. Neste contexto os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs com 19-25 nucleotídeos não codificadores, que são capazes de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional, têm sido identificados com diferentes expressões em diversas doenças, inclusive no câncer. O câncer colorretal apresenta alteração na expressão de diversos miRNAs. Estas alterações têm sido associadas ao diagnóstico, prognóstico, expressão de genes, quimiossensibilidade e estadiamento, sendo potencial biomarcador.

Métodos: Foram revisados e analisados dados clínicos e anatomopatológicos de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica do tumor primário e linfonodos regionais diagnosticados de setembro de 2002 à outubro de 2011 e incluídos no banco de tumores de câncer colorretal do Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS. A análise da expressão dos miRNAs foi realizada no laboratório do Instituto de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília onde foram analisadas nos tumores primários e nos linfonodos regionais, com fins descritivos e frente aos dados clínico-patológicos dos casos estudados. A análise da quantificação dos seguintes miRNA (mir-570, mir-16, mir-338, Let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650 e mir-31) foi realizada por qPCR. Para análise estatística os testes: Exato de Fisher, Wilcoxon e de Kruskal Wallis, considerado nível de significância de 5%.

Resultados: Dos 28 casos estudados, 28,6% tinham menos de 60 anos na ocasião do diagnóstico e 71,4% 60 anos ou mais. A idade média foi de 66,7 anos (26 à 86). A média de seguimento foi de 3,9 anos (0 à 9), DP=2,8 e mediana de 4 anos. A expressão dos miRNAs no tumor primário (N=28) apresentou padrão mais homogêneo, com uma tendência a superexpressão; enquanto que, nos linfonodos doentes (N=15) este padrão foi mais heterogêneo, com o mir-570, mir-338, mir-1, mir-183 e mir-31 apresentando-se superexpressos e mir-16, Let-7, mir-150 e mir-650 com expressão reprimida. A expressão reprimida do mir-570 apresentou associação

com mortalidade quando avaliado no tumor primário (N=28), onde a prevalência de óbito nos indivíduos com expressão reprimida foi de 63,64% e naqueles superexpressos foi de 17,65%, com valor $p=0,020$. No tumor primário dos pacientes com metástase linfonodal (N=15) a mediana de expressão do mir-183 foi de 4,42 com intervalo interquartil p25 de 1,66 e p75 de 43,01; enquanto que, nas amostras de pacientes com linfonodos não doentes (N=13) a mediana de expressão do mir-183 foi de 54,17 com intervalo interquartil p25 de 13,12 e p75 de 223,14, com valor $p=0,01$, sugerindo doença localizada ao diagnóstico. No subgrupo de pacientes com metástase linfonodal (N=15), a expressão do mir-650 no linfonodo foi associada a prevalência de recidiva. A expressão do mir-650 esteve reprimida em 25% dos casos que recidivaram e superexpresso em 85% dos casos, com valor $p=0,04$.

Conclusões: O padrão de expressão dos miRNAs difere conforme o sítio da doença estudada (tumor primário ou doença metastática). A expressão reprimida do mir-570 no tumor primário provavelmente seja preditora de mortalidade. Superexpressão do mir-183 no tumor primário sugere doença localizada ao diagnóstico. A superexpressão do mir-650 no linfonodo metastático é preditor de recidiva. Novos estudos incluindo testes funcionais e metanálises poderão ratificar estes achados e otimizar a utilização destes miRNAs na prática clínica.

Palavras-chave: microRNA, câncer colorretal, biomarcador.

ABSTRACT

COLORECTAL CANCER MICRORNAS EXPRESSION IN TUMOR AND LYMPH NODE SAMPLES

Introduction: Colorectal cancer is the third most common cancer in men and the second in women worldwide. It presents multifactorial, heterogeneous and complex etiopathogeny, still not fully elucidated. The evolution of the disease is often distinct from the exhaustive surgical and pathological staging, eventually (possibly) patients with focal disease develop an aggressive pattern presenting poor prognosis. Recent evidence shows the molecular heterogeneity of colorectal cancer. In this context the microRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs (containing 19-25 nucleotides) capable of regulating gene expression in post-transcriptional level, have been identified with different expressions for numerous diseases, including cancer. Colorectal cancer shows change in expression of several miRNAs. These changes have been associated with the diagnosis, prognosis, gene expression, chemosensitivity and staging, being a potential biomarker.

Methods: Clinical and pathological data of patients submitted to surgical resection of the primary tumor and regional lymph nodes diagnosed from September 2002 to October 2011 have been reviewed and analyzed, and included in the colorectal cancer tumor bank of the São Lucas Hospital's Oncology Department - PUCRS. The analysis of the expression of miRNAs was performed in the laboratory of the Institute of Biotechnology of the Catholic University of Brasilia where they were analyzed in primary tumor and regional lymph nodes for descriptive purposes and versus the clinical-pathological data of the cases studied. The quantification analysis of the following miRNA (mir-570, mir-16, mir-338, Let-7, miR-1, miR-150, mir-183, mir-650 and mir-31) were determined by qPCR. Statistical analysis tests: Fisher's, Wilcoxon and Kruskal Wallis Exact, considered a significance level of 5%.

Results: Of the 28 cases studied, 28.6% were less than 60 years old at diagnosis and 71.4% aged 60 or over. The average age was 66.7 years (26 to 86). The mean (average) follow-up (period, age) was 3.9 years (0 to 9), SD= 2.8 and a median of 4 years. The expression of miRNAs in the primary tumor (N=28) showed more homogeneous pattern, with a tendency to overexpression; whereas, in ill lymph nodes (N=15) this pattern was more heterogeneous, with mir-570, mir-338, mir-1,

mir-183 and mir-31 being presented overexpressed and mir-16, Let-7, mir-150 and mir-650 with a more repressed expression. The suppressed expression of mir-570 was associated with mortality when evaluated in the primary tumor (N=28), where the prevalence of death in individuals with suppressed expression was 63.64% and those overexpressed was 17.65%, with $p=0.020$. In the primary tumor of patients with lymph node metastasis (N=15) the median expression of mir-183 was 4.42 with interquartile range (IQR) p25 of 1.66 and p75 of 43.01; whereas in the samples from patients with no ill lymph nodes (N=13) the median expression of mir-183 was 54.17 with IQR p25 of 13.12 and p75 of 223.14, with $p=0.01$, suggesting focal disease at diagnosis. In the subgroup of patients with lymph node metastasis (N=15), the expression of mir-650 in lymph node was associated with the prevalence of recurrence. The expression of mir-650 showed suppressed expression in 25% of the recurrence cases and was overexpressed in 85% of cases, with $p=0.04$.

Conclusions: The expression pattern of miRNAs differs depending on the site of the disease studied (primary tumor or metastatic disease). The suppressed expression of mir-570 in the primary tumor is likely to be predictor of mortality. Overexpression of mir-183 in the primary tumor suggests focal disease at diagnosis. The overexpression of mir-650 in the metastatic lymph node is a recurrence predictor.

New studies including functional tests and meta-analyzes may confirm these findings and optimize the use of these miRNAs in clinical practice.

Keywords: microRNA, colorectal cancer, biomarker

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Incidência e mortalidade do câncer colorretal em diferentes lugares do mundo em 2012 – acesso em junho de 2015	19
Figura 2: Estimativa da incidência de câncer colorretal no mundo em 2012 – acesso em junho de 2015	20
Figura 3: Estimativa de incidência de câncer colorretal para 2012 nos EUA em ambos os sexos e o efeito demográfico – acesso em junho de 2015	20
Figura 4: INCA – Estimativa do câncer em 2016-2017– acesso em dezembro de 2015.....	21
Figura 5: Biogênese dos miRNAs (Modificado de Garofalo M, 2011).	30
Figura 6: Eletroforese mostrando o RNA extraído das amostras tumorais dos indivíduos com CCR selecionados.....	42
Figura 7: Expressão dos miRNAs estudados nas amostras tumorais e nos linfonodos	46
Figura 8: Expressão dos miRNAs nas amostras de tumor primário, excluindo miRNA 183 (N=28)	48
Figura 9: Expressão dos miRNAs no tumor primário, excluindo valores aberrantes. 48	
Figura 10: Padrão de expressão do mir-183 nas amostras do tumor primário, excluindo dois pacientes com valores > 500.....	49
Figura 11: Expressão dos miRNAs nos linfonodos metastáticos.	50
Figura 12. Expressão dos miRNAs na amostra de linfonodos metastáticos, excluindo expressões aberrantes.....	51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Estadiamento do câncer colorretal por TNM (34).....	23
Tabela 1: MiRNAs envolvidos na patogênese dos câncer colorretal em humanos (81)	32
Quadro 2: Principais características dos miRNAs selecionados para este trabalho..	34
Tabela 2: Nomenclatura e localização dos miRNAs nos cromossomos.....	40
Tabela 3: Características clínico-patológicas dos casos.	44
Tabela 4: Características clínico-patológicas dos casos	45
Tabela 5: Padrão de expressão dos miRNAs no tumor primário.....	47
Tabela 6: Padrão de expressão diferencial dos miRNAs nos linfonodos metastáticos.	51
Tabela 7: Prevalência de óbito e expressão do mir-570	52
Tabela 8: Ocorrência de óbito em relação ao status linfonodal.....	53
Tabela 9: Prevalência de recidiva e expressão do mir-650.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRAF - gene BRAF
cDNA - Ácido Desoxirribonucléico complementar
CEA - antígeno carcinoembrionário
DGCR8 – cofator the DiGeorge Syndrome critical region gene 8 protein
Dicer – Proteína com múltiplos domínios
Dosha - enzima Dosha
EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EUA - Estados Unidos da América
EXP5 – Exportina-5
FAP- Polipose Adenomatosa Familiar
INCA – Instituto Nacional do Câncer
KRAS - gene KRAS
miRNAs - microRNAs
mRNA- ácido ribonucléico mensageiro
MSI-H – alta instabilidade micro-satélite
NHCCP- Câncer de Cólon Hereditário Não Polipoide
°C - grau Celsius
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
Pet-CT – Tomografia Computadorizada com Emissão de Pósitrons
PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
qq - qualquer
QT – quimioterapia
Ran-GTP – Cofactor Ran-tirosina trifosfato
RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA - ácido ribonucléico
RT - radioterapia
SEER – do ingles: *Surveillance, Epidemiology, and End Results*
SG - sobrevida global
TIS - tumor in situ
TNM – tumor, linfonodo e metástase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.2 ASPECTOS CLÍNICOS	21
2.2.1 Sinais e Sintomas.....	21
2.2.2 Fatores de Risco	22
2.2.3. Estadiamento Geral do câncer colorretal	22
2.3 TERAPÊUTICA, FATORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS	24
2.4 miRNA.....	27
2.4.1 miRNA e Câncer	27
2.4.2 LOCALIZAÇÃO E BIOGÊNESE DOS MICRORNAS	29
2.4.3. MiRNA no câncer colorretal.....	31
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MÉTODOS	36
4.1 DELINEAMENTO	36
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	36
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	37
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	37
4.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO	38
4.5.1 Variáveis dependentes	38
4.5.2 Variáveis independentes	38
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAS.....	39
4.6.1 Análise das amostras tumorais	39
4.6.2 Purificação dos miRNA.....	39
4.6.3 Quantificação de miRNA	39
4.6.4 Análise dos dados de miRNA.....	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	42
5.1 QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE RNAs.....	42
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS CASOS	42

5.3 EXPRESSÃO DE MIRNAS NA AMOSTRAS	45
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E COMPARAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS	52
6 DISCUSSÃO	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
8 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na Inclusão dos tecidos no Banco de Tumores	75
Anexo B – Carta de Confirmação do Estudo ao Programa de Pós-Graduação	78
Anexo C – Ficha Clínica para Coleta de Dados	80
Anexo D – Confirmação da Submissão do Artigo	81
Anexo E – Artigo Submetido	82

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres no mundo. Mais de 55% dos casos ocorrem nas regiões mais desenvolvidas (1). Apresenta etiopatogenia multifatorial, heterogênea e complexa, ainda não totalmente elucidada.

Apesar da melhora nas medidas preventivas e terapêuticas, a incidência do câncer colorretal não diminuiu substancialmente nas últimas décadas, estando, inclusive, em elevação nas populações em ritmo acelerado de crescimento econômico (1). O ganho, em termos de sobrevida, é inferior aos avanços tecnológicos.

Ainda não sabemos qual paciente, após ressecção com intuito curativo, irá evoluir com recidiva e qual irá responder ao tratamento adjuvante ou paliativo. A melhor conduta para o tratamento do câncer colorretal tem sido intensamente discutida nos últimos anos, porém sua indicação ainda depende fundamentalmente do estadiamento cirúrgico (2-4). A busca de melhores alternativas terapêuticas, de novos marcadores biológicos e o melhor entendimento dos mecanismos moleculares para compreensão dos fenômenos envolvidos na gênese e desenvolvimento do câncer são de suma importância para individualizar o tratamento desta doença.

Os miRNAs são pequenos RNAs, com 19-25 nucleotídeos não codificadores (5). São capazes de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional através da repressão da tradução ou degradação de moléculas-alvo de RNA mensageiro (6, 7).

Os miRNAs têm sido implicados na maioria das principais funções celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional. Os miRNAs, possivelmente, são responsáveis pela regulação de 1/3 dos genes em humanos e um único miRNA pode regular até 200 genes humanos (6, 8-12), podendo atuar como oncogenes ou supressores tumorais (6, 7).

Diversos estudos descreveram biomarcadores que reforçam a heterogeneidade molecular do câncer colorretal, como mutações de BRAF e KRAS. Tais expressões estão associadas a um pior prognóstico, eventualmente distintas do prognóstico esperado por TNM (13-15).

A expressão alterada de miRNAs tem sido reportada no câncer colorretal, sendo associada a diagnóstico, prognóstico, quimiossensibilidade, estadiamento, expressão gênica e grau de malignidade (16-27).

Este trabalho tem como objetivo principal a identificação do padrão de expressão dos miRNAs mir-570, mir-16, mir-338, Let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650 e mir-31 no tumor primário e linfonodos (primeiro sítio de metástase do câncer colorretal e importante marcador prognóstico e definidor de terapêutica na doença inicial) e correlacionar com características clínico-patológicas dos casos estudados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para esta revisão, a Base de Dados eletrônicos PubMed foi consultada retrospectivamente até o ano de 2005 usando as seguintes palavras-chave: microRNA (microRNA) e câncer colorretal (colorectal cancer). A busca se limitou aos artigos escritos em inglês, realizados em humanos.

Em um segundo momento, a Base de Dados eletrônicos PubMed foi consultada retrospectivamente até o ano de 2010, usando os mesmos critérios de busca e as seguintes palavras-chave: câncer (cancer) e “microRNA nome” (mir-31, mir-183, mir-650, mir-150, Let-7, mir-338, mir-16, mir-570 e mir-1).

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se 746.000 casos de câncer colorretal em homens no mundo, 10% do total de neoplasias malignas e 614.000 casos em mulheres, correspondendo a 9,2% dos cânceres nesta população (1). A distribuição desta neoplasia em mulheres e homens no mundo está demonstrada na figura 1.

A mortalidade é baixa nas regiões mais ricas (8,5%) e alta nas regiões menos desenvolvidas (52%), como apresentado na figura 2.

Nos EUA a incidência em 2012 foi de, aproximadamente, 75.000 homens e 69.000 mulheres, como demonstrado na figura 3.

Cinquenta e cinco por cento dos casos ocorrem nas regiões mais desenvolvidas. Os padrões geográficos são semelhantes em relação ao gênero, sendo que a razão de incidência do sexo masculino para o feminino é de 1,4:1 (1, 28). Em populações em ritmo acelerado de crescimento econômico, como a China, tem se observado um aumento preocupante da incidência desta neoplasia (29, 30). Por outro lado, mesmo em países com índices favoráveis em relação ao controle de doenças e uso de tecnologias, como Estados Unidos, não mostram redução da mortalidade em relação a incidência ao longo das últimas décadas (1).

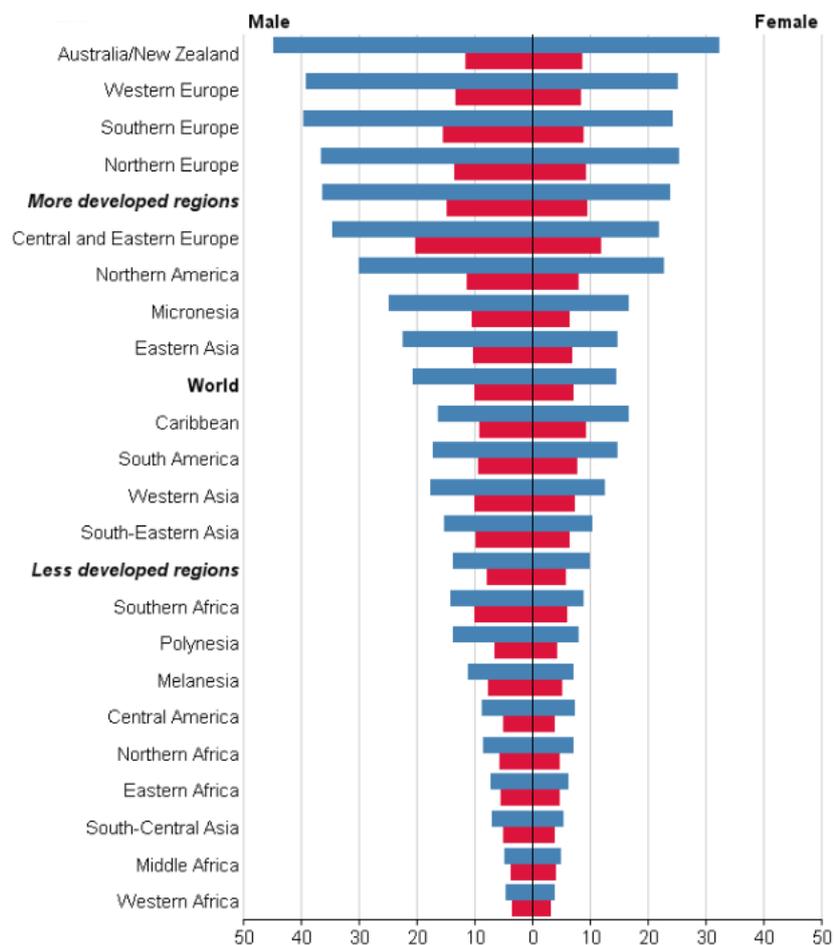
O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil em 2016 é de 16.660 casos em homens e de 17.620 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste e terceiro nas regiões Sul e Centro-Oeste. Nas regiões Nordeste e Norte ocupa a quarta posição. Para as mulheres é o

segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul. Nas regiões, Centro-Oeste, Nordeste e na região Norte é o terceiro mais frequente.

Estes valores correspondem a um risco estimado de 16 casos novos a cada 100 mil homens e 17 a cada 100 mil mulheres como demonstrado na figura 4 (28).

Aproximadamente 25% dos pacientes se apresentam com metástase a distância ao diagnóstico e 50% desenvolverão metástases. A sobrevivência geral em 5 anos para pacientes com diagnóstico de câncer colorretal é de 60% (31).

Figura 1: Incidência e mortalidade do câncer colorretal em diferentes lugares do mundo em 2012 – acesso em junho de 2015



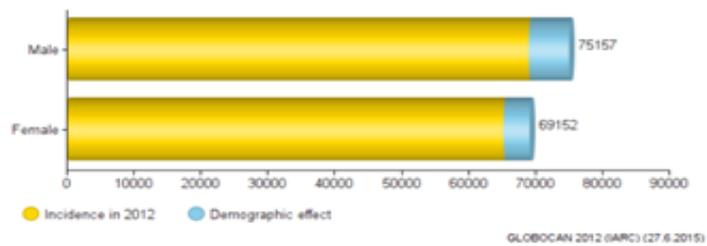
Fonte: www.globocan.iarc

Figura 2: Estimativa da incidência de câncer colorretal no mundo em 2012 – acesso em junho de 2015



Fonte: www.globocan.iarc

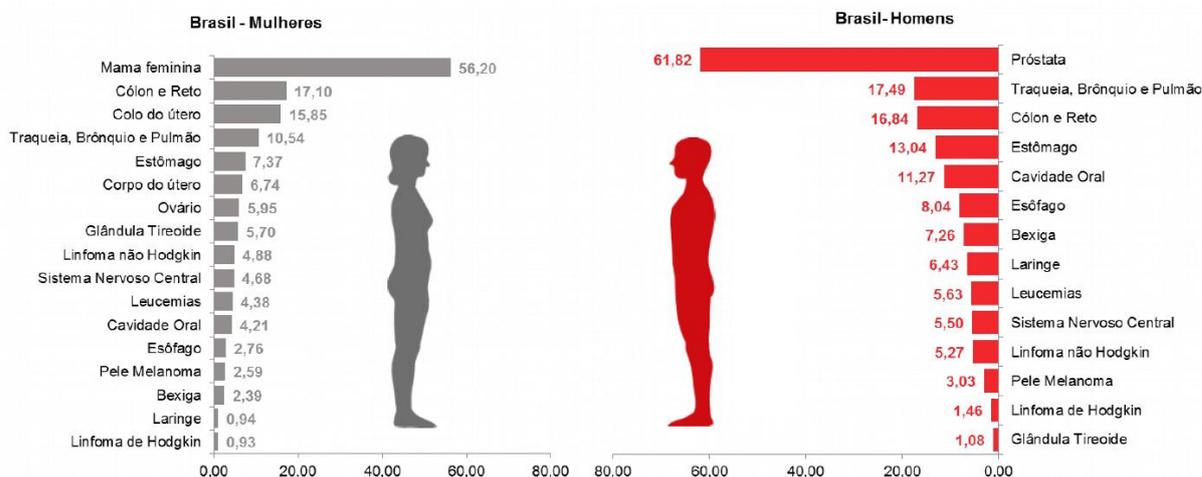
Figura 3: Estimativa de incidência de câncer colorretal para 2012 nos EUA em ambos os sexos e o efeito demográfico – acesso em junho de 2015



Fonte: www.globocan.iarc

Figura 4: INCA – Estimativa do câncer em 2016-2017– acesso em dezembro de 2015.

Taxas brutas de incidência, estimadas para 2016, das localizações primárias*, em homens e mulheres, Brasil



Valores por 100 mil. *Exceto pele não melanoma.

Fonte: www.inca.gov.br

2.2 ASPECTOS CLÍNICOS

2.2.1 Sinais e Sintomas

O câncer colorretal, quando em estágio inicial, usualmente não causa sintomas e sua detecção só é possível por rastreio (3, 4). Usualmente, em tumores grandes e/ou doença avançada, identificam-se sintomas inespecíficos como fadiga, anemia, alteração do hábito intestinal, sangramento digestivo baixo, dor abdominal e perda de peso sem causa específica. Tumores no cólon direito estão mais associados a diarreia e no cólon esquerdo a constipação e sintomas obstrutivos. No câncer de reto além dos sintomas obstrutivos pode haver descrição de fezes em fita e tenesmo (3, 4).

Em casos avançados localmente, a doença poderá se apresentar já com obstrução intestinal. Na ocorrência de metástases a distância, possivelmente haverá sintomas específicos do órgão afetados, como dispneia e tosse no caso de metástases pulmonares, e disfunção hepática ou icterícia no caso de metástases hepáticas (3, 4, 31, 32).

2.2.2 Fatores de Risco

Oitenta por cento dos cânceres de cólon são esporádicos e não associados a síndromes hereditárias (31).

A idade é importante fator de risco, com 90% dos casos ocorrendo depois dos 50 anos (3, 4, 28, 31, 32).

Estilo de vida e fatores pessoais como obesidade, tabagismo, alto consumo de carne vermelha e sedentarismo são fatores de risco reconhecidos no câncer colorretal. São considerados de alto risco para desenvolvimento de câncer de cólon história pessoal de doença inflamatória intestinal, adenomas ou câncer colorretal e história familiar de câncer de cólon ou síndromes hereditárias como Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e Síndrome de Lynch (3, 4, 31, 33).

2.2.3. Estadiamento Geral do câncer colorretal

O estadiamento da neoplasia colorretal é cirúrgico e ainda é a melhor maneira de avaliar o prognóstico individual de cada paciente. A classificação de Dukes foi substituída pelo TNM, mais atual e com grupos prognósticos. A modificação mais importante nos últimos anos foi o entendimento que o número de linfonodos analisados pelo patologista é um dos fatores prognósticos mais importantes. Em pacientes com linfonodos negativos, um mínimo de 12 linfonodos devem ser analisados (34).

A presença de metástases a distância pode ser avaliada com ecografia abdominal total na indisponibilidade de tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética e radiologia do tórax na ausência de tomografia de tórax. O PET-CT pode ser útil na avaliação de metástases hepáticas potencialmente ressecáveis (31, 32). A sobrevida para doença específica estimada em 5 anos de acordo com o banco de dados do *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) estão descritos no quadro 1 (35, 36).

Quadro 1: Estadiamento do câncer colorretal por TNM (34)

T = tumor	N = linfonodo	M = metástase
TX: tumor não avaliável;		
T0: sem evidência de tumor primário		
Tis: carcinoma in situ intraepitelial ou com invasão de lâmina própria		
T1: tumor infiltra a submucosa		
T2: tumor infiltra a muscular própria		
T3: tumor infiltra através da muscular própria até os tecidos pericólicas		
T4a: tumor penetra a superfície do peritônio visceral		
T4b: tumor invade diretamente ou está aderido a outros órgãos ou estruturas.		
NX: linfonodos regionais não avaliáveis		
N0: sem metástases linfonodais		
N1: metástases em 1 a 3 linfonodos regionais		
N1a: metástase em 1 linfonodo regional		
N1b: metástase em 2 a 3 linfonodos regionais		
N1c: depósito de tumor na subserosa, no mesentério, ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais, sem metástases linfonodais regionais.		
N2: metástases em 4 ou mais linfonodos regionais		
N2a: metástases em 4 a 6 linfonodos regionais		
N2b: metástases em 7 ou mais linfonodos regionais		
M0: sem metástases à distância		
M1: metástases à distância		
M1a: metástase(s) confinada(s) a um órgão ou sítio (ex: fígado, pulmão, ovário, linfonodo não regional)		
M1b: metástase(s) em mais de 1 órgão ou sítio ou no peritônio.		

O estadiamento agrupado do câncer cólon e reto define os grupos prognósticos descritos abaixo e a sobrevida (doença específica) estimada em 5 anos de acordo com o banco de dados do *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) está colocada entre parênteses (37).

Cólon

- 0: TisN0M0; I: T1-2N0M0 (>95%)
- IIA: T3N0M0 (85,5%)
- IIB: T4aN0M0 (79,6%)
- IIC: T4bN0M0 (58,4%)
- IIIA: T1-2 N1/N1cM0 (87,6%) ou T1N2aM0 (68,5%)
- IIIB: T3-T4aN1/N1cM0 ou T2-3N2aM0 ou T1-2N2bM0 (60 a 68,7%)
- IIIC: T4aN2aM0 ou T3-4aN2bM0 ou T4bN1-2M0 (19,7 a 34,9%)
- IV: qqTqqNM1

Reto

Análise de 3.791 pacientes submetidos a estudos clínicos multicêntricos americanos agrupou os pacientes em quatro grupos de risco, de acordo com a porcentagem de sobrevida em 5 anos (38):

- baixo (T1-T2N0), 90%;
- intermediário (T1-T2N1 e T3N0), 65 a 73%;
- moderadamente alto (T1-2N2, T3N1e T4N0), 48 a 58% e
- alto (T3N2, T4N+), 30 a 36%.

Recentemente, o Banco de Dados SEER, em revisão de 35.829 pacientes com câncer do reto validou a análise anterior, embora com taxas 7-10% menores em sobrevida para a maioria das categorias T e N, e ressaltou a importância da relação entre o número de linfonodos positivos com o prognóstico (36).

2.3 TERAPÊUTICA, FATORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS

O tratamento do câncer colorretal se baseia na ressecção cirúrgica, quimioterapia citotóxica e radioterapia nos casos de carcinoma de reto. Há um grande interesse em alvos moleculares, tendo em vista que apesar do exaustivo estadiamento cirúrgico, há um comportamento heterogêneo na evolução, resposta à quimioterapia e progressão da doença.

O estadiamento da neoplasia colônica inicial é cirúrgico, e o número de linfonodos analisados pelo patologista é um fator prognóstico importante. A definição N0 requer no mínimo 12 linfonodos avaliados, e negativos (39).

Os paciente com câncer de cólon e estadiamento I tem a recomendação de tratamento cirúrgico exclusivo, já que a probabilidade de cura é alta neste grupo. Já o benefício do acréscimo de quimioterapia após a ressecção cirúrgica completa no estagio II é controverso e depende de grupos de risco frente ao número de linfonodos avaliados, avaliação de margens, lesões T4, presença de perfuração e/ou obstrução, avaliação da instabilidade microssatélite, invasão perineural e/ou angiolímfática (3, 4). Algumas séries identificaram níveis elevados de CEA (antígeno carcino-embrionário) pré-operatório como fator de risco alto (40).

Nos pacientes com estadiamento III, o tratamento adjuvante confere benefício na redução de recorrência predominantemente nos 2 primeiros anos de

acompanhamento, resultando no aumento de sobrevida global (SG), principalmente no estágio III (3, 4, 41, 42).

Nos pacientes com metástases, vários fatores influenciam no resultado do tratamento. Naqueles com doença sincrônica, o tratamento sistêmico exclusivo, isto é, sem ressecção do tumor primário, é seguro quando não há sinais de obstrução ou sangramento (43). Entretanto, nos indivíduos em que se considera a ressecção das lesões metastáticas, a ressecção com intento curativo do tumor primário é imprescindível (44). A ressecabilidade de metástases é fator associado a ganhos significativos em sobrevida e deve ser considerada na escolha da estratégia terapêutica em pacientes em estágio IV. Embora se observe um aumento real na sobrevida de pacientes selecionados submetidos a ressecção hepática (sobrevida em 5 anos da ordem de 60%), o índice de recorrência pode chegar a 80% dos casos (32, 45, 46).

Cerca de 40% dos indivíduos apresentam tumores com mutações no gene KRAS, o que leva a uma resistência total a tratamentos direcionados à via do EGFR, incluindo o Cetuximabe e o Panitumumabe. Portanto, somente aqueles com KRAS selvagem devem ser tratados com essas drogas (47). Aproximadamente 8-12% dos pacientes têm mutação do BRAF (48). O BRAF mutado é um marcador somente de mau prognóstico, mas não preditivo de benefício ao Cetuximabe (49).

No caso do câncer de reto, a introdução da ressecção total do mesorreto claramente influenciou os resultados observados em séries recentes, tornando o treinamento do cirurgião um fator prognóstico de alta relevância (50).

Estágios clínicos iniciais (0 e I) com lesão bem ou moderadamente diferenciada, sem invasão vascular, linfática ou perineural, sem componente mucinoso e ausência de budding (definido como pequeno aglomerado de células indiferenciadas na fronteira invasiva do tumor) a recomendação padrão é a ressecção cirúrgica exclusiva. Já os T2N0 parecem se beneficiar de RT adjuvante. A excisão tumoral transanal é uma alternativa aceitável para os tumores T1 de reto baixo (até 8cm margem anal) com baixo risco de envolvimento linfonodal. O câncer de reto distal apresenta peculiaridades em decorrência da sua drenagem venosa para a veia cava inferior. Apenas o reto proximal é peritonizado. No caso de lesão em reto médio e alto a recomendação é a ressecção anterior baixa com ressecção total do mesorreto, buscando margem proximal de 5 cm e distal de 2 cm. Neste caso, não há necessidade de tratamento adjuvante.

A presença de budding confere pior prognóstico ao paciente (51). Nos Estágios II e III (T3N0 ou T1-4N1-2), a recomendação é tratamento neoadjuvante seguido, após 6 a 8 semanas, de ressecção anterior baixa com ressecção total do mesorreto. O tratamento neoadjuvante consiste de radioterapia combinada à quimioterapia. O tratamento quimioterápico adjuvante (por 4 meses) deve ser considerado após a cirurgia definitiva (32, 52).

Não há recomendação padrão para o estadiamento IV, a conduta é similar do câncer de cólon com estadiamento equivalente, com a opção do acréscimo de radioterapia para otimizar o controle da doença pélvica (32).

Atualmente, o prognóstico e o tratamento dos pacientes ainda são decididos a partir do estadiamento cirúrgico e histológico, usando a classificação TNM. Em pacientes com doença sistêmica (metástase a distância) podemos utilizar a avaliação do KRAS e BRAF para definir a melhor terapêutica, mas não são úteis para definir tratamento em tumores localizados ou localmente avançados (32, 53-58).

O tratamento quimioterápico adjuvante no estágio III do câncer de cólon agrega um ganho de aproximadamente 20% no intervalo livre de doença e a sobrevida global dos pacientes (59, 60); enquanto que, para estágio II o benefício absoluto é de 3 à 6% em 5 anos (baixo e alto risco respectivamente) (61).

Diversos estudos descreveram biomarcadores que reforçam a heterogeneidade molecular do câncer colorretal como mutações de BRAF e KRAS se associando ao pior prognóstico e similar prognóstico em estádios TNM distintos (13-15). Assinaturas genômicas também validadas como OncotypeDX colon câncer (62), ColoPrint, Veridex e GeneFxCOLON (2, 63) são ferramentas úteis para identificar o prognóstico dos casos.

É fato que o prognóstico dos pacientes com câncer colorretal melhorou durante as últimas décadas em detrimento de diagnóstico mais precoce e tratamentos mais efetivos. A média de sobrevida de pacientes com CCR avançado era de 10 a 12 meses quando a terapia era exclusivamente com 5-fluorouracil para mais de 24 meses quando os regimes adicionaram oxaliplatina ou irinotecano e anticorpos monoclonais anti-EGFR e anti-VEGF. O melhor entendimento da via RAS (HRAS, KRAS e NRAS) e sua utilização para definição terapêutica também proporcionou melhores resultados em paciente com CCR avançado, mas sem benefício para outros estadiamentos (64, 65).

Em uma doença heterogênea como o CCR há número expressivo de casos em que não sabemos qual o real benefício do tratamento quimioterápico ou qual paciente agrega a toxicidade e custo do tratamento sem ganho efetivo. Não é incomum identificar casos com excelente prognóstico evoluir mal e casos com prognóstico reservado ao diagnóstico ter longa sobrevivida.

Neste contexto a busca de marcadores que possam guiar a terapêutica e o seguimento de cada caso a partir do seu perfil molecular são de suma importância para melhorar não só a quantidade, mas também a qualidade de vida de pessoas com diagnóstico de câncer de cólon e reto, ofertando um tratamento mais eficaz quando necessário e poupando pacientes de tratamentos sem benefício real.

2.4 miRNA

2.4.1 miRNA e Câncer

Os miRNAs foram descritos pela primeira vez em 1993 por Victor Ambros e colaboradores que identificaram um gene, *lin-4*, que afetava o desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* e produzia um pequeno RNA não codificante, posteriormente denominado miRNA (6, 66).

O primeiro banco de microRNAs (miRBase) registrado, nomeados e descritos foi estabelecido em 2002 e continha 218 miRNAs descritos de 5 espécies (67, 68). Desde então o número de miRNAs identificados em diferentes organismos, plantas e animais, inclusive humanos, expandiu substancialmente e continua aumentando rapidamente.

Os primeiros indícios do envolvimento dos miRNAs na carcinogênese datam de 2002, quando foram identificadas as sequências que codificam o mir-15 e o mir-16 em uma região crítica do cromossomo 13q/14, que está deletada na maioria dos casos de Leucemia Linfocítica Crônica, a partir deste relato, a expressão alterada de miRNAs foi descrita em outras neoplasias malignas (69). Em 2004 miRNAs humanos foram identificados em regiões do genoma associadas a alterações neoplásicas (70), como a superexpressão do mir-155 em linfoma Burkitt (71), seguindo-se de avaliação da expressão em Doença de Hodgkin e Linfoma Difuso de Grandes Células B (72). A partir de então, outros miRNAs passaram a ser estudados originando série de estudos e associações da expressão em diversos cânceres.

Identificado como marcador prognóstico e de diagnóstico, como a superexpressão de mir-191 e mir-199a associados a pior prognóstico em leucemia linfocítica crônica (73), superexpressão de mir-155 e baixa expressão de Let-7a em câncer de pulmão (74), mir-335 e mir-126 associado a inibição de metastases em câncer de mama (75), assim como alterações na expressão de outros miRNAs têm sido descritas em diversos tumores (76).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão dos miRNAs no câncer são diversos. Possivelmente as funções dos miRNAs nas neoplasias malignas sofrem alterações pelos mesmos mecanismos pelos quais afetam a expressão dos genes que codificam proteínas (alterações epigenéticas ou mutações na sequência de DNA) (7).

Em 2008 já havia descrição de miRNAs circulantes, surgindo como potencial biomarcador (77, 78). Devido a estabilidade dos miRNAs, maior facilidade em obter amostras sanguíneas e menor invasividade, estudos com miRNAs circulantes tem sido de especial interesse como o mir-141 que identifica pacientes portadores de câncer de próstata (77) e padrões de expressão associados a câncer de pulmão, colorretal e diabete mellitus (78).

Em junho de 2013 o mesmo banco de miRNAs, miRBase, já descrevia 24.521 miRNAs de 206 espécies (67).

Atualmente o miRBase descreve 1881 precursores e 2588 miRNAs em humanos, muitos associados ao desenvolvimento e progressão do câncer (79-81).

Estes pequenos RNAs não codificadores são conservados durante a evolução e são capazes de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional através da repressão da tradução ou degradação de moléculas-alvo de RNA mensageiro (6, 7).

Os miRNAs têm sido implicados na maioria das principais funções celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional. Um único miRNA pode regular vários genes-alvo diferentes (6, 8-11).

A expressão de miRNAs pode se apresentar desregulada em diversos processos patológicos, incluindo o câncer. A localização dos genes miRNA em sítios frágeis do genoma e as variações na expressão destas moléculas em diversas neoplasias fornecem evidências circunstanciais para a participação das mesmas na tumorigênese. Assim os miRNAs são importantes na manutenção do equilíbrio entre oncogenes e genes supressores tumorais (10, 82-85).

Alguns miRNAs promovem a proliferação celular e inibem a apoptose, outros determinam diminuição da sobrevivência e proliferação celular. São por isso nomeados miRNAs oncogênicos (oncomiRs) e miRNAs supressores tumorais (anti-oncomiRs), que regulam negativamente os genes supressores de tumor e os oncogenes, respectivamente (6, 7, 86).

Os miRNAs podem atuar como supressores tumorais em alguns cânceres, mas como oncogênicos em outros e, eventualmente, com funções opostas (ativação de um gene e desativação de outro) em uma mesma patologia (6).

Discute-se ainda a utilização dos miRNA para o tratamento do câncer, como possível terapia epigenética (87, 88). O fato de em laboratório e em modelos animais a inibição de miRNAs ter resultado em regressão tumoral favorece esta possibilidade. O mir-421, descrito como potencial marcador em câncer gástrico, ao ser inibido promoveu regressão tumoral in vitro (89).

Evidências apontam que a quimioprevenção é capaz de regular a atividade de miRNAs inibindo ou revertendo o processo de carcinogênese, através da ingestão de agentes que ocorrem naturalmente na alimentação ou são ingeridos a partir de fórmulas farmacêuticas como vitaminas (90).

Tantas possibilidades apontam os miRNAs como importantes na patogênese e evolução de doenças humanas como o câncer e que necessariamente devem ser melhor estudados.

2.4.2 LOCALIZAÇÃO E BIOGÊNESE DOS MICRORNAS

Análises genômicas de miRNAs revelam que mais de 50% dos miRNAs em mamíferos estão localizados nas regiões intrônicas. Outros estão localizados nas regiões intergênicas e constituem unidades transcricionais independentes (91).

A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação. Na maioria dos casos, a transcrição dos genes dos miRNAs é mediada pela polimerase II, enquanto um pequeno grupo de miRNAs pode ter a transcrição mediada pela polimerase III.

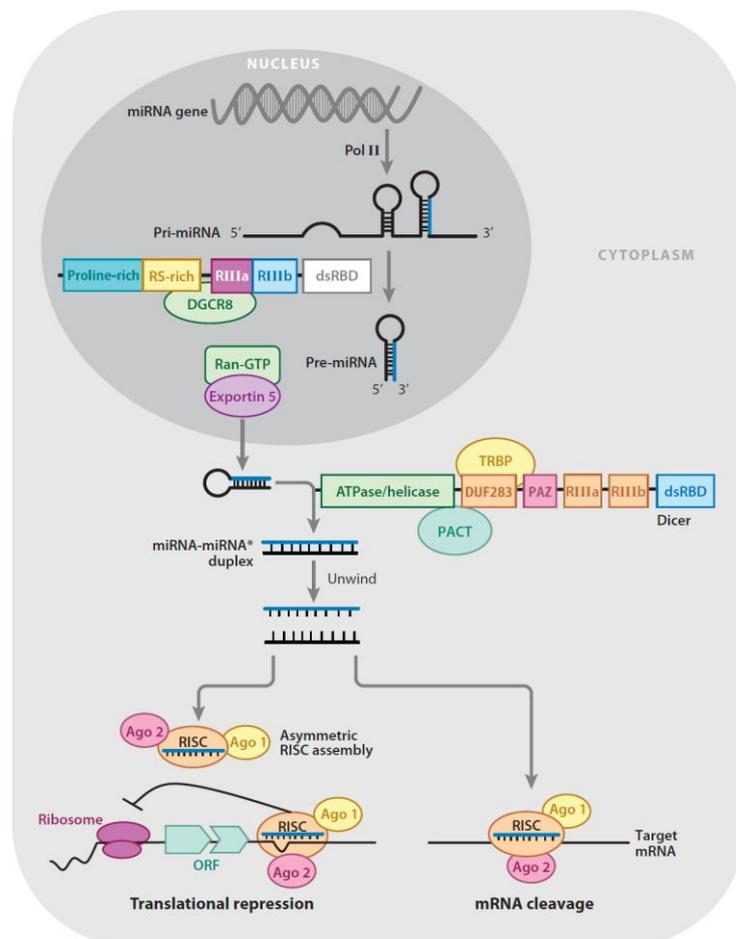
Os nucleotídeos dos transcritos primários nos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias como bastões, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareadas e as regiões de alças circulares, nas quais os pares de bases não são complementares.

No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui a Drosha RNase III ribonuclease e seu co-fator DGCR8 (do inglês DiGeorge syndrome critical region gene 8), uma proteína ligadora de RNA de dupla fita. A estrutura resultante, nomeada miRNA precursor é exportada para o citoplasma por meio da Exportina-5 (EXP5) e seu cofator Ran-guanosina trifosfato (Ran-GTP) (6, 91, 92).

No citoplasma os pré-miRNAs são processados pela enzima Dicer, codificada pelo gene DICER1, que remove a alça do bastão, resultando na formação de um duplex de RNA. Este é incorporado ao complexo de silenciamento no qual duas fitas de RNA são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao Complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e constitui o miRNA maduro, ao passo que a outra fita sofre degradação (6, 93, 94).

O complexo miRNA e RISC pode regular a expressão gênica por meio de dois mecanismos: degradação do mRNA e repressão da tradução do mRNA (10), como esquematizado na figura 5 (6).

Figura 5: Biogênese dos miRNAs (Modificado de Garofalo M, 2011). (6)



2.4.3. MiRNA no câncer colorretal

Muitos estudos descreveram a expressão dos miRNAs com associação ao câncer colorretal, desde a primeira associação descrita em 2003, identificando mir-143 e mir-145 como potenciais fatores na carcinogênese do câncer colorretal (95, 96). Estudos subsequentes identificaram famílias de miRNAs como a Let-7 que se apresentam desreguladas no câncer colorretal (81, 97, 98) elevados níveis de mir-31, mir-96, mir-135 e mir-183 foram identificados em células de câncer colorretal (99), associação com mutação de KRAS, BRAF e p53 (100, 101), mir-101 foi inversamente associado a superexpressão de COX-2, que sabidamente está envolvida na invasividade e crescimento celular no CCR (102) apresentados na Tabela 1 (81).

Slattery e colaboradores avaliaram a expressão de miRNAs em CCR de diferentes localizações e subtipos com padrão de expressão diferente quando comparado com tecido normal (103).

Lin e colaboradores compararam a expressão de miRNAs em amostras de tumor colorretal e metástases hepáticas identificando um padrão similar em ambas malignidades, sugerindo uma importante função destes miRNAs na patogênese e progressão do câncer e não somente na carcinogênese (104).

Tabela 1: MiRNAs envolvidos na patogênese dos câncer colorretal em humanos (81)

miRNA	Gene target	Up (↑) or down (↓) regulated
<i>miR-16-1</i>	<i>p53</i>	↑
<i>miR-17-5p</i>	<i>PTEN, DLC1 and ZBP1</i>	↑
<i>miR-18a</i>	<i>K-RAS</i>	↑
<i>miR-20a</i>	<i>PTEN, RUNX1 and TP53INP1</i>	↑
<i>miR-21</i>	<i>PTEN and PDCD4</i>	↑
<i>miR-29a</i>	<i>DNMT3a, DNMT3b and MCL1</i>	↑
<i>miR-31</i>	<i>BMP2</i>	↑
<i>miR-92</i>	<i>p63</i>	↑
<i>miR-96</i>	<i>K-RAS</i>	↑
<i>miR-122a</i>	<i>APC</i>	↑
<i>miR-135a</i>	<i>MSH2 and APC</i>	↑
<i>miR-135b</i>	<i>APC</i>	↑
<i>miR-181b</i>	<i>VSNLI</i>	↑
<i>miR-182</i>	<i>IGFR1</i>	↑
<i>miR-183</i>	<i>Ezrin</i>	↑
<i>miR-196b</i>	<i>HOXB8</i>	↑
<i>miR-9-1</i>	<i>TCF4 and MSH2</i>	↓
<i>miR-34b</i>	<i>CDK4, CDK6, E2F3 and CyclinE2</i>	↓
<i>miR-34c</i>	<i>CDK4, CDK6, E2F3 and CyclinE2</i>	↓
<i>miR-101</i>	<i>COX-2</i>	↓
<i>miR-129-2</i>	<i>NOTCH1 and CAMTA1</i>	↓
<i>miR-137</i>	<i>MITF</i>	↓
<i>miR-143</i>	<i>DNMT3a, K-RAS and p53</i>	↓
<i>miR-145</i>	<i>IRS-1 and p53</i>	↓

Outros estudos foram publicados com novos miRNAs priorizando novas associações, prognósticos e diagnóstico de câncer colorretal e perfil de quimiosensibilidade. Novas informações sobre a expressão em diferentes locais e tecidos como tumor primário, linfonodos metastáticos, metástases a distância, tecido normal, doença pré-maligna como adenomas, fezes e sangue agregaram outras interpretações sobre os miRNAs (16-27).

Os miRNAs mir-29a e mir-92a estão superexpressos no plasma de pacientes com CCR e associados a estádios avançados por TNM, sendo potenciais marcadores não invasivos desta doença (105).

Os miRNAs mir-135 e mir-21 se apresentam superexpressos nas fezes de pacientes com CCR, descritos como potencial método de rastreamento a ser desenvolvido (106, 107).

A superexpressão do mir-21 está associada a baixa sensibilidade e pior resposta a quimioterapia em pacientes com CCR, sua inibição promoveu aumento

da resposta a quimioterapia (108). A expressão do mir-145 está comumente suprimida em CCR, a restauração desta expressão in vitro tem sido associada a inibição da proliferação tumoral e aumento da sensibilidade a radioterapia (25, 109).

Estudos apontam a possibilidade de quimioprevenção em CCR com uso de vitamina D regulando o mir-22 (comumente superexpresso) e com cúrcuma (*Curcuma longa*) regulando o mir-21 (comumente reprimido) (110, 111).

Dentre as muitas possibilidades de estudo com miRNAs, foram selecionados os miRNAs mir-570, mir-16, mir-338, Let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650 e mir-31, tendo em vista sua associação com tumores colorretais, mas ainda não estudados em relação as metástases linfonodais e características clínico patológicas de câncer colorretal. A principal função e características destes miRNAs, bem como as referências que guiaram esta escolha, estão descritos no quadro 2.

A busca por marcadores moleculares tem sido o “Graal” dos pesquisadores de miRNAs, pois podem apontar o caminho para diagnósticos mais precoces, prognósticos mais realistas, terapias mais efetivas e menos onerosas do ponto de vista financeiro, de toxicidade e psicológico e de uma futura terapia epigenética.

Este trabalho pretende contribuir com a identificação do padrão de expressão dos miRNAs mir-570, mir-16, mir-338, Let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650 e mir-31 no tumor primário e linfonodos, primeiro sítio de metástase do câncer colorretal e importante marcador prognóstico e definidor de terapêutica na doença inicial, e correlacionar com características clínico patológicas dos casos estudados.

Quadro 2: Principais características dos miRNAs selecionados para este trabalho.

miRNA	Características	Referência
miR-570	Inibe a tradução da proteína B7-H1, associada com progressão de câncer gástrico quando superexpressa. Um dos 4 miRNAs superexpressos fortemente associados com pacientes sem recorrência de CCR.	(112, 113);(114)
miR-16	Supressor tumoral. Quando subexpresso é fator preditivo de pior prognóstico em câncer colorretal. Subexpresso em 67% dos CCR. Ligado à via de sinalização p53 e Survivina em câncer colorretal. Superexpressão induz apoptose e inibe proliferação.	(115) (116-118)
miR-338	Supressor tumoral. Subexpresso em CCR. Baixa expressão causa superexpressão da proteína Smoothened (SMO) com diminuição da proliferação.	(119, 120)
Let-7g	Função de supressão tumoral. Altos níveis associados com melhor taxa de sobrevida. Tem como alvo o mRNA do gene KRAS. Expressão associada a radiosensibilidade tumoral.	(121-124)
miR-1	Um dos miRNAs mais subexpressos em cânceres e em CCR. Associado à inibição de TAGLN2 (Transgelin 2 gene). Dados sugerem que possa funcionar como ativador da doença metastática.	(125-129)
miR-150	Subexpresso em CCR, metástases hepática de CCR e outros cânceres. Função de supressão tumoral. Expressão associada a maior sobrevida e resposta a quimioterapia adjuvante. Importante na tumorigênese do CCR.	(130-133)
miR-183	Superexpresso em CCR com pior prognóstico, estádios avançados ao diagnóstico, metástases linfonodais e a distância. Associada ao status da expressão de instabilidade microssatélite.	(22, 134, 135)
miR-650	Envolvido com metástase linfonodal e a distância em CCR. Associado ao gene <i>NDRG2</i> (N-Myc Downstream-regulated gene 2), um supressor de tumor associado com crescimento celular, diferenciação e apoptose, subexpresso em vários tipos de câncer.	(136)
miR-31	Superexpresso em CCR. Tem como alvo RASA1 (uma proteína que quando inibida leva à ativação da via de sinalização RAS em CCR). Superexpressão associada com pior sobrevida global e câncer específica para diversos cânceres a carcinogênese no CCR Associado com mutação de BRAF e mortalidade em CCR.	(137-144)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar os padrões de expressão diferencial dos miRNAs no tumor primário e linfonodos de amostras de câncer colorretal.

3.2 Objetivos específicos

-Verificar a expressão dos miRNAs em pacientes com câncer colorretal e relacionar com o gênero, idade ao diagnóstico, cor da pele, localização do tumor, estadiamento ao diagnóstico, sobrevida livre de progressão e status vital ao final do estudo.

-Verificar se existe diferença na expressão dos miRNA entre as amostras dos tumores primários e os respectivos linfonodos metastáticos.

4 MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Este Projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Sistema de Pesquisa da PUCRS sob código SIPESQ 5960 e após aprovação do orçamento, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética via Plataforma Brasil sob número CAAE 44457915.0.0000.5336. Foi desenvolvido estudo de observação, descritivo e analítico.

Inicialmente foi realizado um estudo transversal para determinar a prevalência da expressão dos miRNAs nas amostras de tumores primários e de casos de câncer colorretal do banco de tumores do Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS.

Em um segundo momento, foi desenvolvido um estudo tipo coorte retrospectivo com componentes contemporâneos para determinar a ocorrência dos desfechos clínicos nos pacientes.

Foram revisados e analisados dados clínicos e anatomopatológicos de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica do tumor primário e linfonodos regionais diagnosticados entre setembro de 2002 à outubro de 2011 e incluídos no banco de tumores de câncer colorretal do Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS.

Os dados epidemiológicos foram analisados mediante seguimento dos pacientes no ambulatório de Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS, através da revisão do prontuário. Dados pendentes foram resgatados mediante coleta de dados diretamente do paciente ou familiar através do contato telefônico do prontuário hospitalar do paciente ou diretamente com o médico assistente do caso na ocasião do diagnóstico.

A principal variável do estudo (expressão dos miRNAs) foi analisada através da quantificação de miRNA por meio de qPCR nas amostras de tumor e linfonodos.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foram utilizadas amostras frescas conservadas em nitrogênio líquido de tumores de câncer colorretal e linfonodos do banco de tumores do Serviço de

Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS de pacientes que fazem acompanhamento no mesmo serviço conforme concordância prévia em participar da pesquisa e mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na inclusão dos tecidos no Banco de Tumores (Anexo A). Além disso, o pesquisador se compromete, através da assinatura de um Termo de Compromisso de Confidencialidade dos Dados coletados dos prontuários dos pacientes.

Das 150 amostras de tumor primário e linfonodos metastáticos do banco de tumores de câncer colorretal do Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS com data do diagnóstico de setembro de 2002 à outubro de 2011, foram selecionados 28 amostras viáveis para este trabalho.

Para auxiliar na coleta dos dados clínicos foi utilizada uma ficha clínica contendo as variáveis de interesse (Anexo B).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos pacientes maiores que 18 anos de idade com diagnóstico histopatológico de câncer colorretal submetidos a ressecção cirúrgica do tumor primário e diagnosticados de setembro de 2002 à outubro de 2011 e incluídos no banco de tumores de câncer colorretal do Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas – PUCRS.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos todos os pacientes que apresentaram uma ou mais das condições abaixo listadas:

- Paciente submetido a tratamento quimioterápico prévio;
- Paciente submetido a tratamento radioterápico prévio do abdômen ou pelve;
- Paciente com diagnóstico de outra neoplasia concomitante ou prévia, exceto câncer de pele não melanoma;
- Pacientes com amostras tumorais inadequadas para análise da expressão dos miRNAs.

4.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

4.5.1 Variáveis dependentes

Foi analisada a expressão dos miRNAs no tumor primário de câncer colorretal e linfonodos regionais. Descritos como variável contínua e como categórica. Na dicotomização da variável categórica, valores <1 foram considerados como reprimidos e >1 superexpressos.

4.5.2 Variáveis independentes

As variáveis analisadas em relação a expressão dos miRNAs estão descritas abaixo e foram coletada e/ou do prontuário médico dos pacientes em questão e/ou mediante coleta de dados diretamente do paciente ou familiar e/ou com o médico assistente na ocasião do diagnóstico.

- Sexo.
- Cor da pele.
- Idade ao diagnóstico.
- Data do diagnóstico = data da biópsia.
- Localização do tumor.
- Invasão camadas do intestino por TNM (T).
- Comprometimento linfonodal por TNM (N).
- Estadiamento ao diagnóstico (TNM).
- Tempo para progressão da doença em meses, definido como o tempo decorrido entre o diagnóstico e a recorrência da doença.
- Status vital ao final do estudo e/ou do acompanhamento.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAS

4.6.1 Análise das amostras tumorais

A análise da expressão dos miRNAs foi realizada no laboratório do Instituto de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília em caráter de parceria entre as duas instituições.

5.6.2 Purificação dos miRNA

As amostras foram conservadas em RNAlater e/ou nitrogênio líquido, ambas armazenadas a -80°C.

O kit mirVana (Ambion, EUA) foi utilizado para extrair RNA total dos tecidos de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração os RNA foram analisados em gel de agarose 1% (eletroforese) e tiveram sua concentração e pureza determinados pelo Qubit e Nanodrop.

4.6.3 Quantificação de miRNA

A quantificação de miRNA foi realizada por meio de qPCR, utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e o kit TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems). Esse kit inclui adaptadores que permitem a produção de cDNA representando o miRNA de interesse, além de iniciadores e uma sonda que permite a reação. A reação foi feita utilizando a máquina StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) conforme recomendações do fabricante. Para este trabalho o mir-570, mir-16, mir-338, Let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650, mir-31 foram analisados e como controle endógeno foi utilizado o “small RNA RNU-6B”. A Tabela 2 mostra a nomenclatura e localização destes miRNAs nos cromossomos (67, 145)

Tabela 2: Nomenclatura e localização dos miRNAs nos cromossomos

miRNA	Localização Cromossomo
hsa-miR-650	22
hsa-miR-570	3
hsa-let-7g	3
hsa-mir-183	7
hsa-miR-31	9
hsa-miR-338-3p	17
hsa-mir-150	19
hsa-mir-1-1	20
hsa-miR-16-1	13
RNU-6B (controle)	10

4.6.4 Análise dos dados de miRNA

A quantificação relativa (RQ) dos miRNA foi determinada utilizando o método comparativo de $\Delta\Delta Cq$. Este é um método no qual a expressão do gene da amostra é medido com base em uma amostra de referência, ou controle endógeno (calibrador). O método de $\Delta\Delta Cq$ calcula as diferenças nas expressões gênicas primeiramente calculando o ΔCq (média da triplicata do Cq do gene alvo menos a média da triplicata do Cq do gene constitutivo). A partir desses dados, se calcula o $\Delta\Delta Cq$ (subtração de dois ΔCq que se quer analisar, como por exemplo o ΔCq do tumor ou linfonodo menos o ΔCq do normal). A partir daí, é dado um número que varia entre 0 e 1 quando a amostra é reprimida (já que a amostra padrão tem valor igual a 1), e se o número é acima de 1, essa amostra é superexpressa em relação ao tecido normal (146).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir das fichas com os dados clínicos e histopatológicos devidamente preenchidas, as mesmas foram digitalizadas no programa EXCEL para posterior tratamento estatístico.

Foi utilizado o software Stata, versão 11.2. Para a descrição das variáveis numéricas, média e desvio-padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQ), juntamente com a amplitude.

Para a descrição das variáveis categóricas, frequência absoluta e relativa, os testes estatísticos empregados foram o teste exato de Fisher (para variáveis categóricas) ou os testes não paramétricos de Wilcoxon e de Kruskal Wallis (para variáveis numéricas).

As variáveis de miRNAs foram avaliadas como contínuas inicialmente e, em um segundo momento como categóricas. Foram consideradas expressões <1 como reprimida e >1 como superexpressa.

Foi gerada uma variável padrão de miRNA no tumor primário e no subgrupo de linfonodos doentes a partir de uma análise fatorial de componentes principais. Esta variável “padrão” foi posteriormente dividida em tercis (menor para maiores expressões) para fins de análise (147, 148).

O cruzamento entre as diferentes expressões de RNA foi feito mediante a correlação de Spearman.

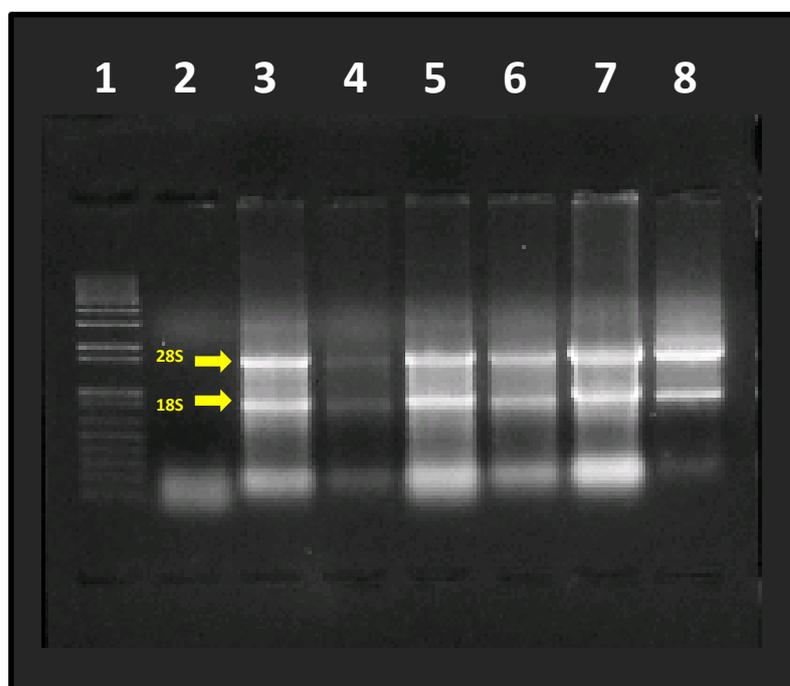
Foi considerado o nível de significância de 5% para testes bicaudais.

5 RESULTADOS

5.1 QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE RNAs

Para a detecção dos miRNAs, o RNA total das amostras foi extraído e como pode ser visto na figura 5, preenchendo os critérios de qualidade da amostra, uma vez que as bandas 28 e 18s são visíveis e não apresenta contaminação com DNA genômico e nem presença de Rastro representando degradação. (Figura 6).

Figura 6: Eletroforese mostrando o RNA extraído das amostras tumorais dos indivíduos com CCR selecionados.



Poço: 1 - Marcador de massa molecular 1Kb Ladder (Invitrogen).

Poço: 2 - controle negativo – água destilada

3 a 8 - RNA de diferentes amostras tumorais obtidos após a extração e quantificação no Qibut.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS CASOS

Dados coletados dos 28 pacientes caracterizam a amostra quanto a idade, gênero, estadiamento inicial, cor da pele, sítio anatômico da neoplasia, recidiva, tempo de seguimento e status vital, conforme descrição individual apresentada na tabela 3 e agrupada na tabela 4.

Todas as amostras tumorais são de adenocarcinoma primário do cólon ou do reto.

A data do diagnóstico variou de 27/9/2005 à 26/7/2011, sendo que metade dos pacientes foi recrutada até 13/12/2007.

O tempo de seguimento variou de 0 à 9 anos com média=3,9 (DP=2,8), com mediana de 4 anos.

Quanto a faixa etária dos casos estudados, 28,6% tinham menos de 60 anos na ocasião do diagnóstico e 71,4% 60 anos ou mais. A idade média foi de 66,7 anos, com mediana de 70 anos, variando de 26 à 86 anos.

Dos 10 casos (35,7%) que apresentaram recidiva, o intervalo para recidiva variou de 1 à 42 meses, com média=14,6 meses (DP=13,8), com mediana de 9 meses.

Quanto a causa do óbito 60% (6 pacientes) foram devido a progressão do câncer, 40% (4 pacientes) não relacionada a progressão da doença e 1 paciente não teve a causa do óbito identificada.

Tabela 3: Características clínico-patológicas dos casos.

	Idade	Gênero	TNM	EC	Cor	Sítio	Recidiva (meses)	Seguimento (anos)	SV
1	77	F	T3N0M0	IIA	B	COLON	NÃO	5	V
2	81	M	T3N2bM0	IIIB	B	COLON	7	3	V
3	67	M	T3N1bM0	IIIB	B	RETO	NÃO	5	V
4	78	M	T3N1aM1a	IVA	B	COLON	NÃO	0,3	M
5	83	M	T4aN2bM0	IIIC	B	RETO	10	1	M
6	84	F	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	NÃO	8	V
7	80	M	T3N1bMx	IIIB	B	RETO	2	0,5	M
8	83	M	T3N2bM0	IIIC	NB	COLON	NÃO	4	V
9	52	M	T3N0M0	IIA	B	COLON	8	2	M
10	76	M	T3N1M0	IIIB	B	COLON	NÃO	7	V
11	53	M	T1N0M0	I	B	COLON	NÃO	7	V
12	86	F	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	36	4	V
13	65	M	T3N0M0	IIA	B	COLON	42	8	V
14	60	M	T3N1aMx	IIIB	B	COLON	NÃO	6	V
15	46	F	T3N0M0	IIA	B	COLON	NÃO	7	V
16	70	F	T4aN1aM1	IV	B	COLON	6	2	M
17	70	M	T4aN0M0	IIB	B	COLON	NÃO	7	V
18	77	F	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	*	*	*
19	80	M	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	NÃO	3	V
20	67	M	T4aN1bMx	IIIC	B	COLON	NÃO	0,1	M
21	59	F	T4aN1bM0	IIIB	B	COLON	11	1	M
22	59	M	T3N2bM1	IV	B	COLON	12	1	M
23	26	F	T3N2bM0	IIIC	NB	COLON	26	1	M
24	60	F	T3N0M1	IV	B	COLON	NÃO	2	V
25	38	F	T3N2aM0	IIIB	B	COLON	NÃO	4	V
26	80	M	T4aN0M0	IIB	B	COLON	NÃO	0,6	M
27	30	F	T3N1bM0	IIIB	NB	COLON	NÃO	4	V
28	82	F	T3N0M0	IIA	B	COLON	NÃO	4	V

Idade – em anos

sexo- F=feminino M=masculino

EC=estadiamento clínico agrupado TNM

Cor da pelo= B=branco NB=não branco

SV=status vital V=vivo M=morto

Tabela 4: Características clínico-patológicas dos casos

Idade		
<60	8	28,6%
≥60	20	71,4%
Gênero		
Feminino	12	43%
Masculino	16	57%
EC		
I	1	3,6%
II	11	39,3%
III	12	42,8%
IV	4	14,3%
Cor da pele		
Branca	25	89,3%
Não branca	3	10,7%
Sítio primário		
Cólon	25	89,3%
Reto	3	10,7%
Status vital ao final do seguimento		
Vivos	17	60,7%
Mortos	10	35,7%
Ignorado	1	3,6%

5.3 EXPRESSÃO DE MIRNAS NA AMOSTRAS

O padrão de expressão dos miRNAs foram estudados nas amostras tumorais em relação ao linfonodo, N=28 apresentados na figura 7 e descritos na tabela 5.

Como é possível observar na figura 7, o mir-570 e mir-338 foram 14 vezes mais expressos no tumor em relação ao seu linfonodo, o mir-16 2,5 vezes mais expresso, Let-7 1,5 vezes mais expresso, mir-1 esteve 29 vezes mais expresso, mir-183 apresentou expressão aberrante estando 260 vezes mais expresso, mir-650 2,5 vezes mais expresso, mir-31 15 vezes mais expresso e o mir-150 se apresentou reprimido quase 2 vezes menos que no linfonodo.

O mir-570 apresentou média de expressão de 12,2 (0,3 -272,5), mir-16 2,5 (0,006–42), mir-338 7,0 (0,05-135), Let-7 1,5 (0,04–24,6), mir-1 30,0 (0,02-471,6), mir-150 0,1 (0,0-1,5), mir-183 268 (0,3-5374), mir-650 1,9 (0,01-13,7) e mir-31 18,9 (0,03-206,1) conforme apresentado na tabela 5.

Figura 7: Expressão dos miRNAs estudados nas amostras tumorais e nos linfonodos

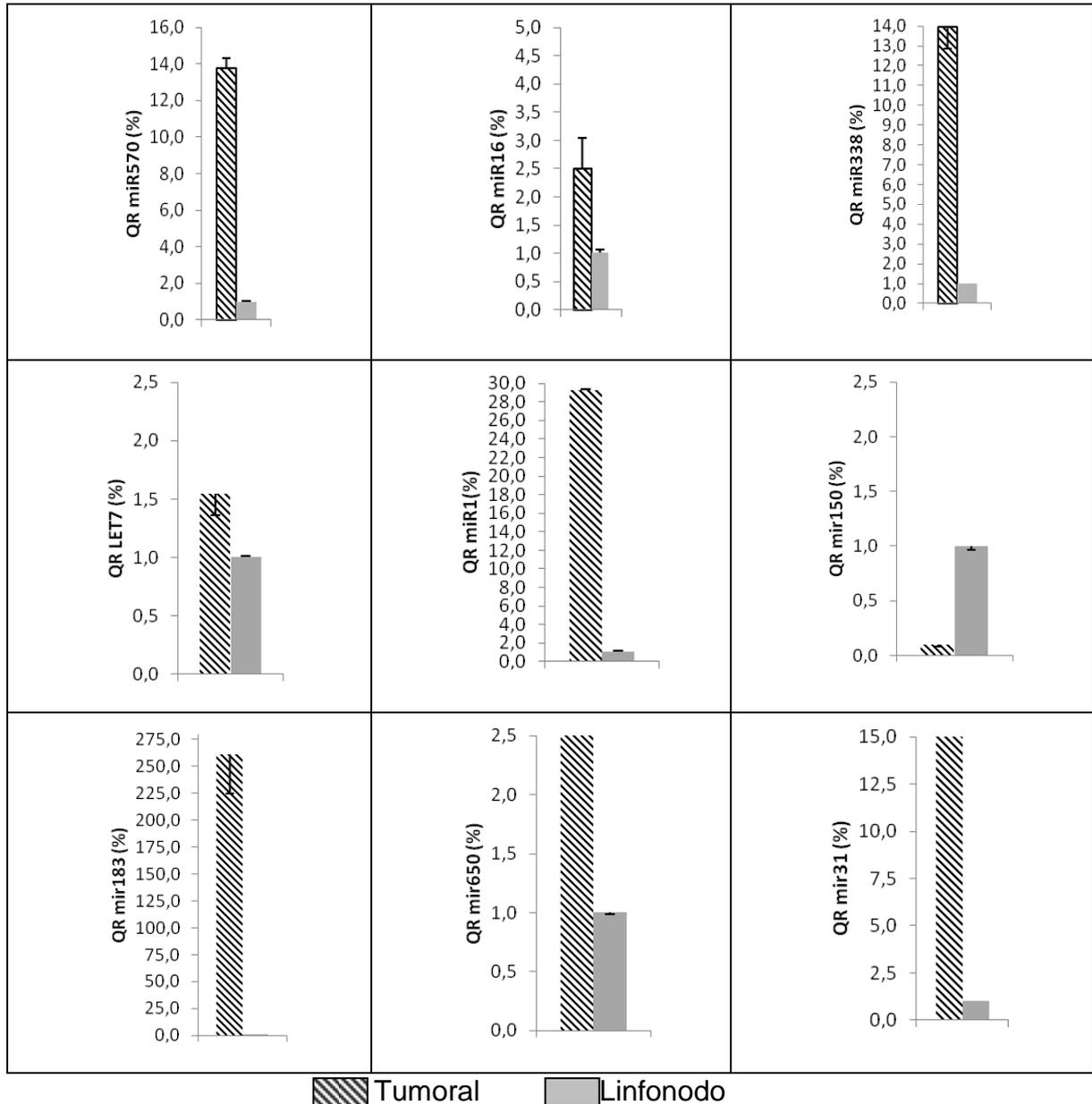


Tabela 5: Padrão de expressão dos miRNAs no tumor primário.

MICRORNA	MÉDIA	VARIAÇÃO	DP	MEDIANA	IQ
MIR-570	12,2	0,3 a 272,5	52,1	1,2	0,65 a 2,32
MIR-16	2,5	0,06 a 42,0	8,0	0,5	0,27 a 1,20
MIR-338	7,0	0,05 a 135,4	25,8	1,2	0,53 a 3,00
LET-7	1,5	0,04 a 24,6	4,7	0,4	0,22 a 1,09
MIR-1	30,0	0,02 a 471,6	101	1,3	0,73 a 6,27
MIR-150	0,1	0,0 a 1,5	0,3	0,03	0,01 a 0,06
MIR-183	268	0,3 a 5374	1028	13,2	3,94 a 83
MIR-650	1,9	0,01 a 13,7	3,4	0,4	0,14 a 2,21
MIR-31	18,9	0,03 a 206,1	48,7	1,3	0,30 a 4,51

A distribuição dos casos conforme a expressão dos miRNAs está apresentada nas figura 8 e 9, onde é possível observar que todos estão mais superexpressos.

O mir-183 está apresentado na figura 10. Este está sendo apresentado separadamente pois apresenta grande variação e expressões aberrantes em relação aos demais miRNAs estudados, variou de 0,3 a 5374, com média=268 (DP=1028) e mediana=0,3.

Figura 8: Expressão dos miRNAs nas amostras de tumor primário, excluindo miRNA 183 (N=28)

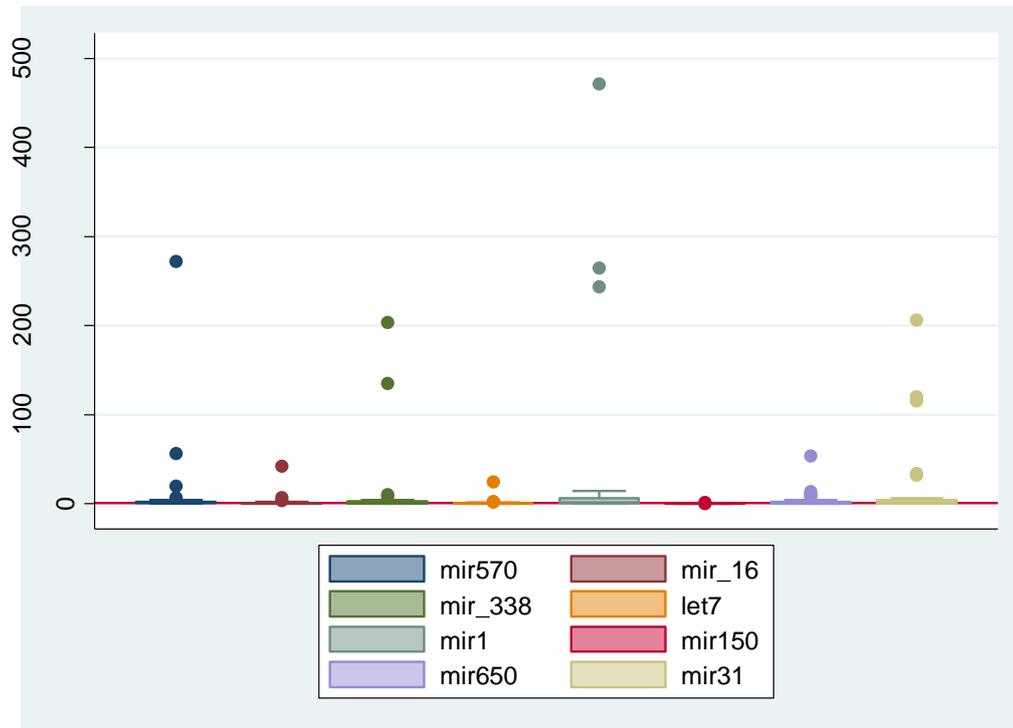
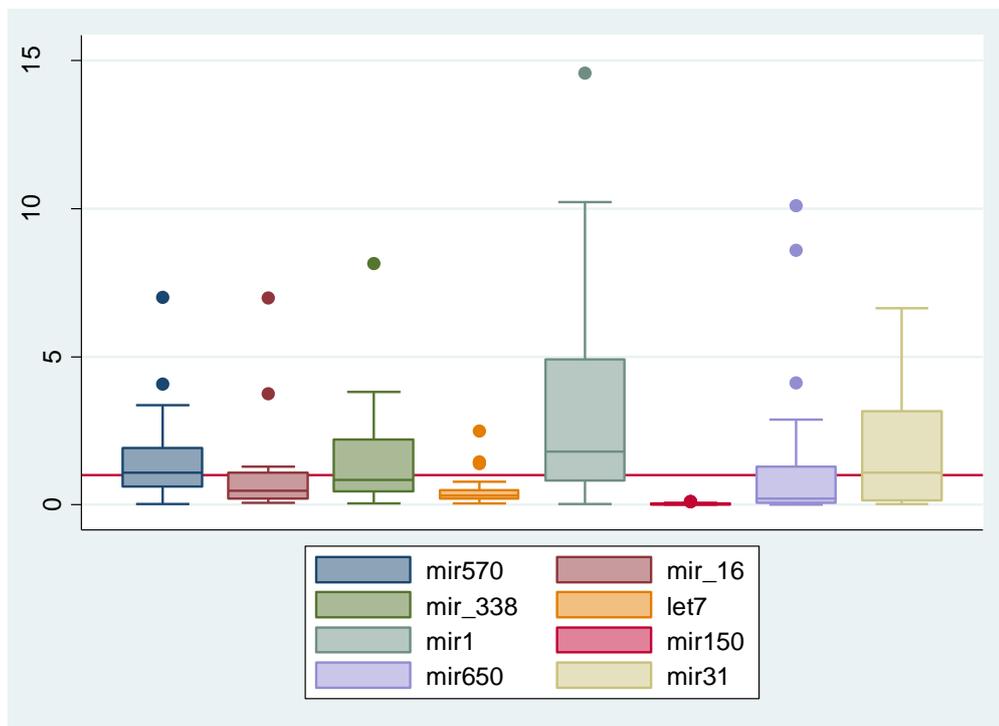
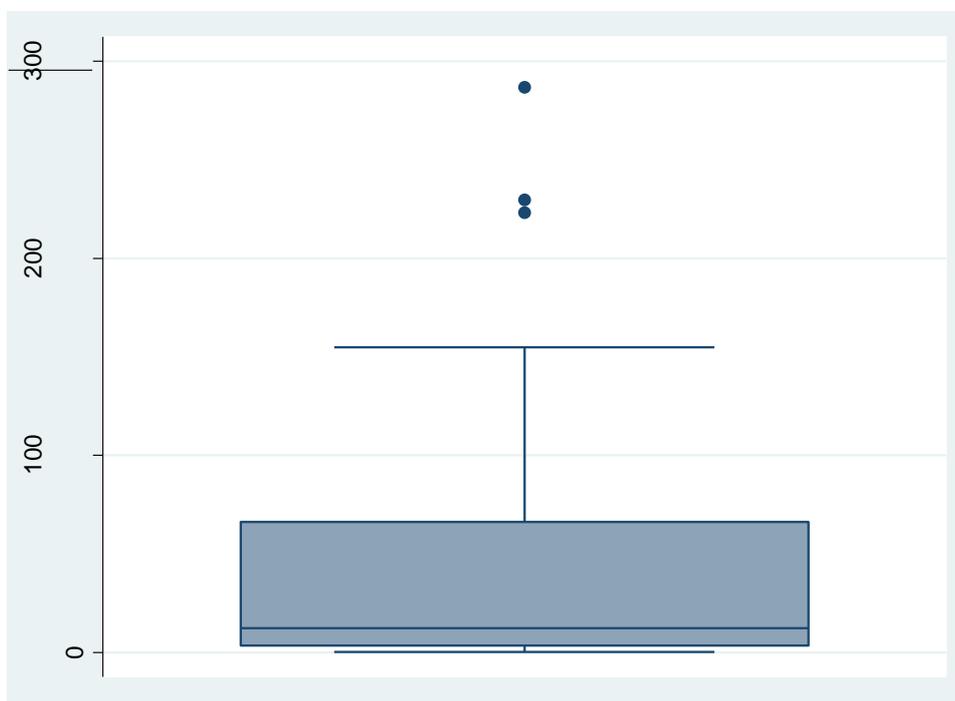


Figura 9: Expressão dos miRNAs no tumor primário, excluindo valores aberrantes.



Excluídos: mir-1 > 100 (n=3) e mir-31 > 30 (n=3), totalizando N=22.

Figura 10: Padrão de expressão do mir-183 nas amostras do tumor primário, excluindo dois pacientes com valores > 500



Foi realizada uma análise do subgrupo dos casos com comprometimento linfonodal, N=15, onde foi avaliada a expressão dos miRNAs nos linfonodos metastáticos em relação a linfonodo normal, apresentados na figura 11 e descritos na tabela 6.

É possível observar na figura 11 que o mir-31 e mir-650 no linfonodo metastático estão 1,2 vezes mais expresso que no linfonodo sem doença, mir-183 está 40 vezes mais expresso, mir-1 e mir-338 6 vezes mais expresso, Let-7 1,3 vezes mais expresso, mir-16 1,4 vezes mais expresso, mir-570 1,6 vezes mais expresso e o mir-150 mais reprimido em relação ao linfonodo 1,5 vezes.

O média de expressão do mir-570 nos linfonodos metastáticos foi de 1,61 (0,02-6,99), mir-16 1,43 (0-6,79), mir-338 5,49 (0-38,79), Let-7 1,28 (0-5,52), mir-1 5,78 (0-55,68), mir-150 0,57 (0-2,16), mir-183 39 (0,01-449), mir-650 1,19 (0-4,13) e mir-31 1,16 (0-4,87) conforme descrição na tabela 6.

O distribuição da amostra dos linfonodos metastáticos em relação a expressão dos miRNAs está apresentada na figura 12. É possível observar que há uma maior variação da expressão dos miRNAs, onde mir-570, mir-338, mir-1, mir-183 e mir-650 estão superexpressos e mir-31, mir-150, Let-7 e mir-16 apresentam expressão reprimida.

Figura 11: Expressão dos miRNAs nos linfonodos metastáticos.

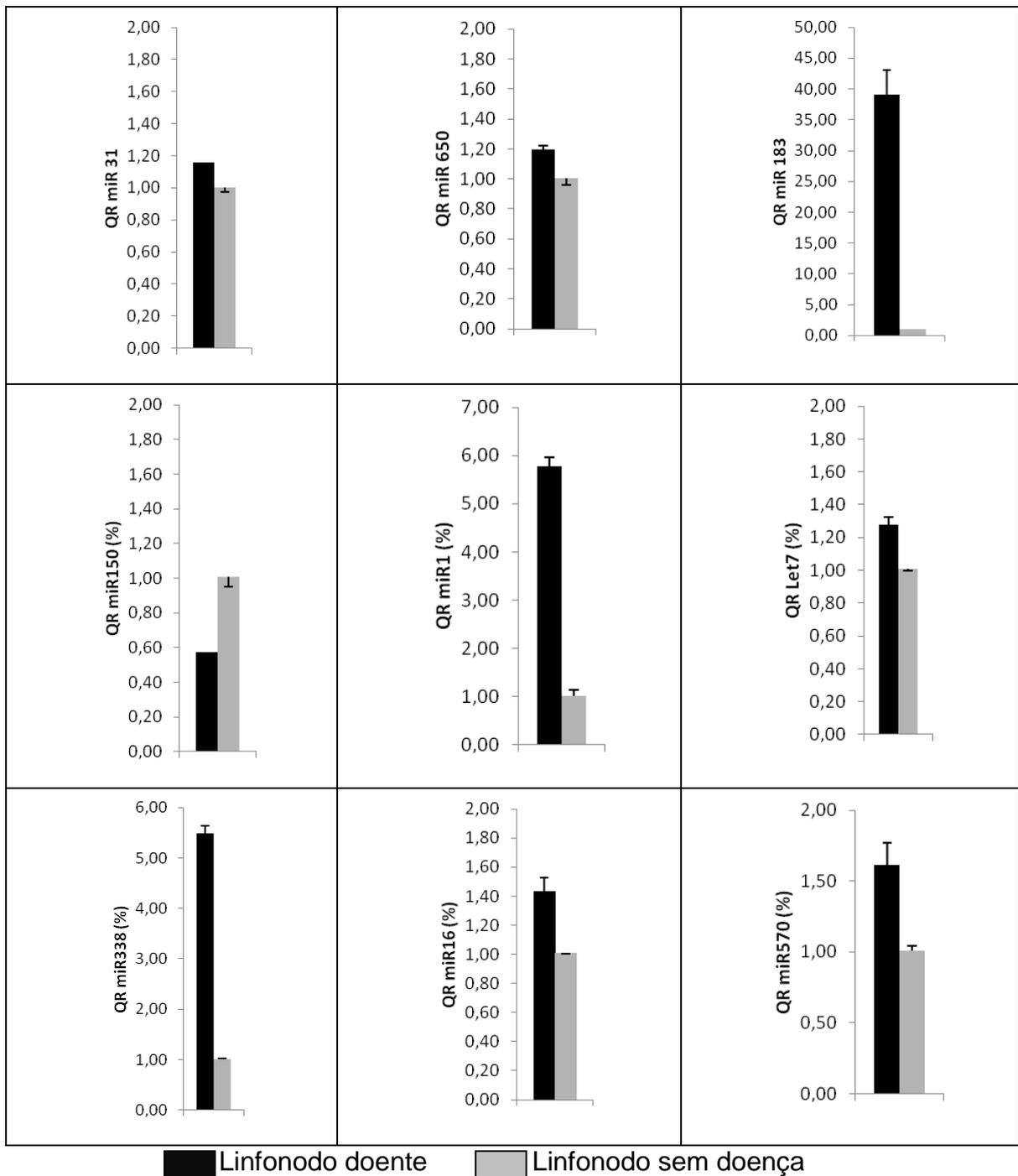
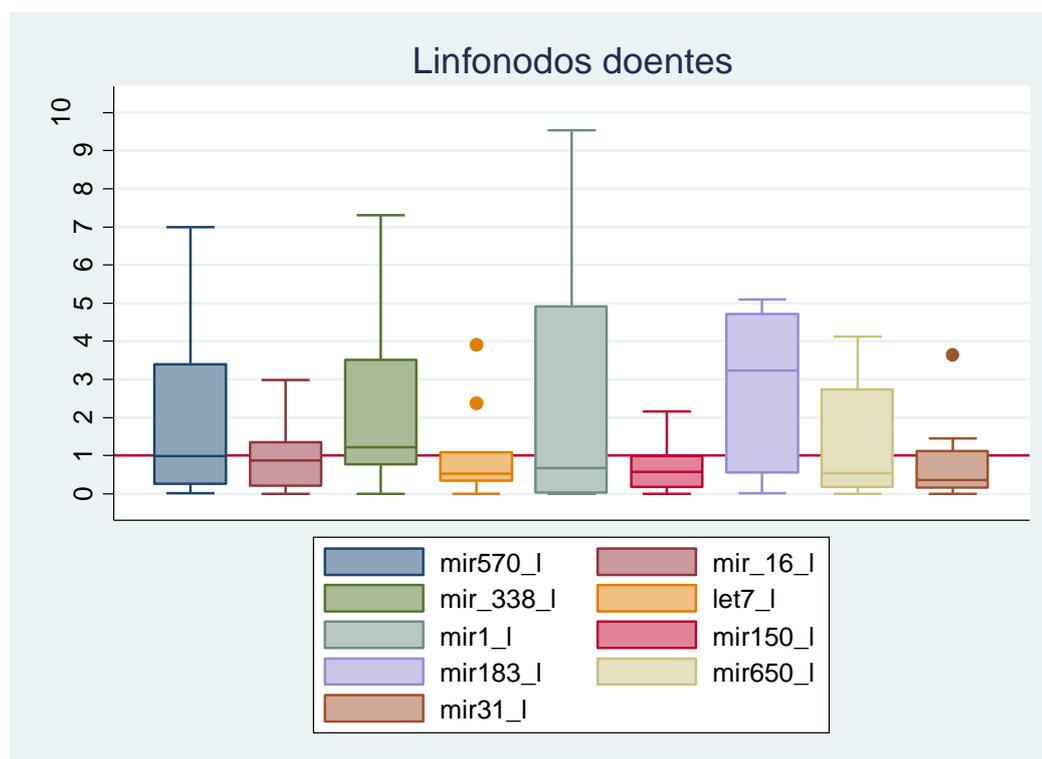


Tabela 6: Padrão de expressão diferencial dos miRNAs nos linfonodos metastáticos.

MICRORNA	MÉDIA	VARIAÇÃO	DP	MEDIANA	IQ
MIR-570	1,61	0,02 a 6,99	1,96	0,99	0,27 a 2,33
MIR-16	1,43	0 a 6,79	1,73	0,88	0,36 a 1,98
MIR-338	5,49	0 a 38,79	9,68	2,05	0,77 a 7,13
LET-7	1,28	0 a 5,52	1,55	0,68	0,38 a 1,72
MIR-1	5,78	0 a 55,68	14,09	0,99	0,04 a 4,92
MIR-150	0,57	0 a 2,16	0,57	0,50	0,07 a 0,98
MIR-183	39,0	0,01 a 449	115	4,22	0,62 a 5,33
MIR-650	1,19	0 a 4,13	1,21	0,80	0,22 a 1,81
MIR-31	1,16	0 a 4,87	1,42	0,52	0,17 a 1,46

Figura 12. Expressão dos miRNAs na amostra de linfonodos metastáticos, excluindo expressões aberrantes.



Excluídos: pacientes com mir1_l>50 (n=1) e mir_338_l>30 (n=1) e mir183_l>20 (n=3), totalizando N=11.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E COMPARAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS

Foi realizada análise fatorial dos miRNAs estudados, criando uma variável padrão dos miRNAs a partir das nove variáveis. Para isso, foi excluído o paciente identificado como número 20, com expressões distintas dos demais, a fim de melhorar a qualidade da variável.

Tal variável foi categorizada em tercís a partir de uma análise fatorial de componentes principais (miRNAs). A variável gerada explicou 82% da variabilidade das nove variáveis de miRNAs. Todas elas ficaram com carga fatorial acima de 0,5, o que é considerado satisfatório (147, 148). No entanto, apesar de a variável padrão haver expressado bem todas as variáveis de miRNA, ela não se associou com as demais variáveis estudadas.

Dicotomizando as variáveis de miRNA, surgiram duas associações estatisticamente significativas em relação aos miRNAs mir-570 e mir-183.

A prevalência de óbito nos indivíduos com expressão reprimida (menor que 1) do mir-570 no tumor primário foi 63,64% e naqueles superexpressos (maior que 1) foi de 17,65%, com valor p do teste exato de Fisher de 0,020. Apresentado na tabela 7.

Tabela 7: Prevalência de óbito e expressão do mir-570

Mir570	não	sim	total
<1	4 (36,36%)	7 (63,64%)	11 (100%)
>1	14 (82,35%)	3 (17,65%)	17 (100%)
Total	18 (64,29%)	10 (35,71%)	28 (100%)

Teste Exato de Fisher=0,020

Ao comparar a expressão do mir-183 no tumor primário de pacientes com linfonodos metastáticos versus a expressão no tumor primário de pacientes com linfonodos sem doença, vê-se que este miRNA está superexpresso nos tumores com linfonodos sem a doença.

No grupo com linfonodos comprometidos (15 pacientes) a mediana de expressão do mir-183 foi de 4,42 com intervalo interquartil p25 de 1,66 e p75 de 43,01; enquanto que, no grupo sem comprometimento linfonodal (13 pacientes) a

mediana de expressão do mir-183 foi de 54.17 com intervalo interquartil p25 de 13,12 e p75 de 223,14. Com valor $p=0,01$ do teste de Wilcoxon. Para esta análise foi excluído o caso número 20 com expressões aberrantes.

Ao comparar a ocorrência de óbito em relação ao status linfonodal, (metastático ou não) houve uma maior ocorrência de óbito no grupo com linfonodos doentes (53,33%) do que no grupo com linfonodos normais (15,38%), com associação limítrofe, $p=0,055$ conforme apresentado na tabela 8.

Todos os pacientes que morreram devido ao câncer (6 pacientes) tinham linfonodos metastáticos, com tempo de acompanhamento menor em relação aos demais ($p=0,03$).

Tabela 8: Ocorrência de óbito em relação ao status linfonodal

linfonodo	não	sim	total
sem doença	11 (84,62%)	2 (15,38%)	13 (100%)
metastático	7 (46,67%)	8 (53,33%)	15 (100%)
total	18 (64,29%)	10 (35,71%)	28 (100%)

Teste Exato de Fisher=0,055

Quanto maior o estadiamento, maior foi a ocorrência de óbito (0, 18, 42 e 75% para os estádios I, II, III e IV, respectivamente), observando-se um gradiente dose-resposta na predição de letalidade, mas com valor p de 0,16.

Pacientes com mais miRNAs expressos tenderam a morrer mais por outras causas que não o câncer. Dos 3 pacientes analisados que morreram por outras causas, 2 deles (67%) pertenciam ao grupo com superexpressão de miRNA. Já os dois pacientes do grupo com de miRNAs reprimidos que morreram, tiveram como causa a progressão do câncer, $p=0,17$. No subgrupo de pacientes com linfonodos doentes (metastáticos) $N=15$, onde foi avaliada a expressão dos miRNAs nos linfonodos doentes em relação o linfonodo normal, a variável fatorial criada para representar a expressão dos microRNAs não apresentou poder para tal, onde alguns miRNAs tiveram correlação negativa. Ou seja, pacientes com maior número de

miRNA expressos para um tiveram miRNAs reprimidos para outro, como o mir-183 e mir-150 com correlação negativa de -0,23.

No subgrupo em questão, a expressão do mir-650 foi associada a prevalência de recidiva.

A expressão do mir-650 esteve reprimida em 25% dos casos que recidivaram e superexpresso em 85% dos casos, com valor $p=0,04$, conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 9: Prevalência de recidiva e expressão do mir-650.

Mir-650	não	sim	total
<1	6 (75%)	2 (25%)	8 (100%)
>1	1 (14,29%)	6 (85,71%)	7 (100%)
Total	7 (46,67%)	8 (53%)	15 (100%)

Teste Exato de Fisher = 0,041

Analisando separadamente o subgrupo de pacientes com linfonodos metastáticos (15 pacientes), em relação a expressão dos miRNAs no tumor primário (em relação ao seu linfonodo) e no linfonodo doente (em relação ao linfonodo normal), observa-se uma correlação negativa para a maioria dos microRNAs. Esta correlação chega a -0,73 para o mir-183 e -0,67 para o mir-16.

Nos outros casos não houve correlação, mas nenhum caso a correlação foi positiva. Isto significa que maiores valores em um grupo repercutem em menores valores no outro e vice-versa.

6 DISCUSSÃO

Os miRNAs surgem como uma nova possibilidade na interpretação do comportamento de doenças heterogêneas como o câncer (19). Estudos publicados recentemente trazem novas possibilidades e associações do diagnóstico precoce e rastreio, melhor definição do prognóstico e terapêutica e no tratamento de doenças com manipulação de miRNAs (108, 110, 112, 124, 126).

Neste trabalho foram utilizadas amostras tumorais e linfonodais de um banco de tumores iniciado em 2002, com o intuito de termos um período adequado de seguimento dos casos. Esta escolha possibilitou um longo seguimento, com a possibilidade de acompanhar a evolução individual de cada caso.

No entanto, tivemos um baixo aproveitamento das amostras mais antigas, tendo em vista que o trabalho com RNAs exige material ideal para tal. A qualidade final depende de múltiplos fatores incluindo a coleta no bloco cirúrgico, resgate de material na patologia após confirmação da histologia (como nos linfonodos por exemplo), armazenamento e transporte adequados e rotina exaustiva na extração dos RNAs (evitar contaminação, escolher a melhor amostra).

Provavelmente a qualidade da coleta e a conservação foi melhorada ao longo dos anos possibilitando a utilização de amostras a partir do ano de 2005 de um banco iniciado em 2002.

Assim, dos 150 casos selecionados, 28 foram elegíveis para este estudo.

O fato de a amostra ser pequena dificulta associações estatisticamente significativas. Sendo possível somente quando a variável estudada apresenta uma grande diferença em estar ou não presente. Assim podemos não identificar associações que existam, mas por outro lado as associações encontradas passam a ser de grande interesse.

Quanto as características clínico-patológicas da amostra, é possível observar que seguem o padrão da patologia estudada quanto a distribuição por faixa etária, sexo, sítio anatômico, estadiamento e histologia. Assim, apesar da amostra ser pequena é representativa da patologia em questão.

Confirmando este raciocínio, a ocorrência de óbito foi maior no grupo com linfonodos metastáticos, bem como o tempo de seguimento foi menor, com associação limítrofe. Os 6 pacientes que tiveram como a causa do óbito o câncer tinham linfonodos doentes. É fato que o comprometimento linfonodal é o principal

fator prognóstico em câncer colorretal. Concluímos que o dado encontrado está de acordo com o padrão desta patologia e a associação foi limítrofe porque a amostra é pequena.

O estadiamento por TNM é o padrão para avaliação prognóstica em muitos cânceres, incluindo o câncer colorretal. Os achados de ocorrência de óbito são diretamente proporcionais ao estadiamento, sendo possível identificar um gradiente dose-resposta na predição de letalidade o que ratifica a qualidade da amostra estudada.

O padrão de expressão dos miRNAs no tumor primário em comparação ao seu linfonodo se direciona para superexpressão.

O padrão de expressão dos miRNAs estudados nos linfonodos doente apresentou direções distintas, mantendo o padrão de superexpressão para o mir-570, mir-338, mir-1, mir-183 e mir-31 mas reprimido no mir-16, Let-7, mir-150 e mir-650.

Confirmando este dado, a variável fatorial criada para representar a expressão dos miRNA apresentou poder quando analisamos a expressão no tumor primário, onde todas as expressões estão na mesma direção (superexpressão). Ou seja, indivíduos com maiores valores de um miRNA tenderam a apresentar maiores valores para os demais também.

Já a variável fatorial criada para representar a expressão dos miRNAs dos linfonodos metastáticos não apresentou poder para tal, já que as expressões aqui nem sempre estiveram na mesma direção, onde alguns miRNAs tiveram correlação negativa. Ou seja, pacientes com superexpressão para alguns apresentaram-se reprimidos para outro, como o mir-183 e mir-150 com correlação negativa de -0,23.

Assim podemos concluir que nos linfonodos doentes a expressão dos miRNAs estudados é mais heterogênea (diferentes sentidos de associação) e no tumor primário este padrão de expressão é mais homogêneo.

Corroborando com a heterogeneidade destes achados, Slattery e colaboradores descreveram diferentes expressões de miRNA dependendo da localização, subtipo, síndrome genética ou doença inflamatória intestinal, mostrando que a expressão dos miRNAs não segue sempre um padrão tecidual, mas uma característica da doença encontrada (149). Zhou e colaboradores mostrou que o padrão da expressão dos miRNAs é modificável pela exposição a quimioterápicos (150). Huynt e colaboradores revisaram a importância de estudar aberrações

epigenéticas nos linfonodos de malignidades como o câncer colorretal, tendo em vista sua potencial utilidade como biomarcador, eventualmente diferente de outros tecidos (151).

Estes dados sugerem que na interpretação dos achados em estudos com miRNAs a amostra tecidual é muito relevante, bem como o miRNA em questão. Talvez, em câncer colorretal, a informação dos linfonodos regionais comprometidos seja mais representativa que o tumor primário.

Christensen e colaboradores descreveram quatro miRNAs, entre eles o mir-570, que quando superexpressos em câncer colorretal apresentavam associação com recorrência, quando comparados a pacientes sem recorrência (114).

Em câncer gástrico, a superexpressão do mir-570 foi associada ao grau de diferenciação e infiltração tumoral e metastatização linfonodal, possivelmente através da inibição da tradução da proteína B7-H1. Indicando que o mir-570 pode influenciar na expressão proteica e modificando a suscetibilidade tecidual ao câncer e sua progressão (113).

Neste estudo, a expressão reprimida do mir-570 no tumor primário se associou com óbito. Assim, supõe-se que este miRNA é preditor de expectativa de óbito quando avaliado no tumor primário de câncer colorretal. Este achado vai de encontro com os achados descritos na literatura.

O mir-183 está habitualmente superexpresso em amostras de CCR em comparação com o tecido normal e sua ação se dá através da inibição de genes supressores tumorais (22, 135, 152, 153). A superexpressão do mir-183 está associada a estadiamento avançado de câncer colorretal, metástase linfonodal e a distância e pior prognóstico. Sendo, portanto, um biomarcador de pior prognóstico (134).

Neste estudo a maior expressão de mir-183 no tumor primário sugere doença localizada ao diagnóstico, distinto dos dados descritos até então. No entanto, não sabemos se a doença inicial aumenta a expressão ou a menor expressão faz com que a doença tenha maior poder de metastatização. É possível que esta discrepância se deva a heterogeneidade dos estudos em diferentes tecidos e estádios tumorais, localização e técnicas.

A superexpressão do mir-650 está associado a metástases linfonodais e a distância de CCR. N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) é um gene supressor tumoral, está presente nos tecidos normais e praticamente indetectável

em vários cânceres. Feng L e colaboradores demonstraram que este gene, em câncer colorretal, está suprimido quando na presença do mir-650. Este dado sugere que este miRNA é um regulador direto da expressão gênica em câncer colorretal (136).

Xueli Zhang e colaboradores descreveram a superexpressão do mir-650 em câncer gástrico promovendo a proliferação e metastatização linfonodal e a distância (154).

Neste estudo, no linfonodo doente de câncer colorretal, a superexpressão do mir-650 se associou com recidiva. Corroborando com os dados da literatura citados acima. No entanto, esta associação não foi demonstrada no tecido do câncer no intestino. Talvez a avaliação deste miRNA seja mais importante no linfonodo do que no tumor primário para prever recidiva, já que não houve associação identificada na expressão deste miRNA na análise do tumor primário.

Não foi possível analisar separadamente as amostras de câncer de cólon das amostras de câncer de reto, devido ao número limitado de casos. Talvez ao analisar separadamente pudéssemos identificar expressões e associações distintas, já que são doenças com terapêutica e prognóstico também distintos (3, 4). No entanto, outros miRNAs estudados em câncer colorretal como mir-143, mir-145 e mir-31 não demonstraram diferença estatística na expressão ou associação com dados clínico-patológicos ao comparar câncer de colon e câncer de reto separadamente (96). Mas é um dado passível de discussão, que merece elucidação em outros estudos com maior número de casos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A identificação da expressão de miRNAs e sua associação com dados clínico-patológicos e evolução da doença amplia o entendimento do complexo mecanismo para formação e evolução de doenças como o câncer.

Somente a partir destes dados há possibilidade de desenvolver testes diagnósticos e prognósticos.

A possibilidade de avaliar miRNAs em soro/plasma/fezes fornece grande vantagem em relação a tecido/biópsia/material cirúrgico, havendo a necessidade da validação da expressão em amostras não teciduais e desenvolvimento de técnicas adequadas.

A partir da identificação da expressão dos miRNAs é fundamental o desenvolvimento de estudos com análise funcional destes miRNAs. Assim é possível verificar se o aumento da expressão ou o silenciamento destes miRNAs em culturas de células é capaz de inibir ou promover crescimento celular, confirmando os achados dos estudos iniciais.

Para cada potencial biomarcador é necessário identificar a função molecular e o mecanismo de desregulação que dê suporte ao uso clínico e possibilite alvos terapêuticos.

Há grande potencial e expectativas em relação aos miRNAs se tornarem alvos terapêuticos de agentes anticâncer. Antes há um grande desafio no desenvolvimento de animais modelo, avaliação detalhada da farmacocinética e farmacodinâmica dessas moléculas, via segura para aplicação, quanto e por quanto tempo é necessária exposição. Assegurar que o miRNA seja efetivo na doença em questão e não em outros tecidos, tendo em vista que pode ter ações distintas em diferentes tecidos.

Assinaturas epigenéticas poderão ser consideradas, usando uma combinação de expressão de diferentes miRNAs, isto poderia minimizar a discrepância encontrada entre os estudos.

Estudos de metanálises são importantes para agregar e validar o grande volume de informações sobre miRNAs, gerando informações para pesquisas futuras.

O acúmulo de informações sobre miRNAs e a adequada interpretação destes achados serão determinantes para que se tornem marcadores mais efetivos,

possam melhorar o entendimento da doença e o desenvolvimento de possíveis alvos terapêuticos com a tão sonhada terapia epigenética.

Outros estudos são necessários para ampliar o conhecimento dos miRNAs em câncer colorretal e validar as associações encontradas neste trabalho.

8 CONCLUSÕES

Foi possível analisar o padrão de expressão dos miRNAs propostos neste estudo nas amostras tumorais e linfonodais de câncer de cólon e reto de um banco de tumores com amostras frescas de tecidos posteriormente conservados em nitrogênio líquido.

Ao verificar a expressão dos miRNAs frente aos dados clínicos (idade, gênero, estadiamento inicial, cor da pele, sítio anatômico da neoplasia, recidiva, tempo de seguimento e status vital) foi possível identificar associação estatisticamente significativa nas seguintes situações: expressão reprimida do mir-570 no tumor primário provavelmente seja preditora de mortalidade, superexpressão do mir-183 no tumor primário sugere doença localizada ao diagnóstico e superexpressão do mir-650 no linfonodo metastático é preditor de recidiva.

Houve diferentes padrões de expressão quando analisados no tumor primário ou linfonodo, sugerindo que a interpretação deverá estar relacionada com o tecido estudado e não somente com o miRNA.

Novos estudos são necessários, com maior número de casos, diferentes sítios de metástases, fezes e sangue para validar os dados deste trabalho e ampliar o conhecimento sobre miRNAs. O acúmulo destas informações é determinante para que os miRNAs possam se tornar efetivos biomarcadores em câncer colorretal com utilidade na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [26/6/2015].
2. Dienstmann R, Salazar R, Taberero J. Personalizing Colon Cancer Adjuvant Therapy: Selecting Optimal Treatments for Individual Patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(16):1787-96.
3. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 6:vi64-72.
4. Glimelius B, Tiret E, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 6:vi81-8.
5. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
6. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011;51:25-43.
7. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *Apmis*. 2007;115(10):1090-106.
8. Kozomara A, Hunt S, Ninova M, Griffiths-Jones S, Ronshaugen M. Target repression induced by endogenous microRNAs: large differences, small effects. *PloS one*. 2014;9(8):e104286.
9. Lu J, Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome research*. 2012;22(7):1243-54.
10. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*. 2007;171(3):728-38.
11. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):259-69.
12. Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell death and differentiation*. 2010;17(2):200-8.
13. Roth AD, Delorenzi M, Tejpar S, Yan P, Klingbiel D, Fiocca R, et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(21):1635-46.
14. Popovici V, Budinska E, Tejpar S, Weinrich S, Estrella H, Hodgson G, et al. Identification of a poor-prognosis BRAF-mutant-like population of patients with

- colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(12):1288-95.
15. Xie T, G DA, Lamb JR, Martin E, Wang K, Tejpar S, et al. A comprehensive characterization of genome-wide copy number aberrations in colorectal cancer reveals novel oncogenes and patterns of alterations. *PloS one*. 2012;7(7):e42001.
 16. Dong Y, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer management and research*. 2014;6:405-22.
 17. Della Vittoria Scarpati G, Calura E, Di Marino M, Romualdi C, Beltrame L, Malapelle U, et al. Analysis of differential miRNA expression in primary tumor and stroma of colorectal cancer patients. *BioMed research international*. 2014;2014:840921.
 18. Schee K, Fodstad O, Flatmark K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer. *The American journal of pathology*. 2010;177(4):1592-9.
 19. Wang F, Wong SC, Chan LW, Cho WC, Yip SP, Yung BY. Multiple regression analysis of mRNA-miRNA associations in colorectal cancer pathway. *BioMed research international*. 2014;2014:676724.
 20. Wang CJ, Stratmann J, Zhou ZG, Sun XF. Suppression of microRNA-31 increases sensitivity to 5-FU at an early stage, and affects cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *BMC cancer*. 2010;10:616.
 21. Zhang JX, Song W, Chen ZH, Wei JH, Liao YJ, Lei J, et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis. *The Lancet Oncology*. 2013;14(13):1295-306.
 22. Zhang QH, Sun HM, Zheng RZ, Li YC, Zhang Q, Cheng P, et al. Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. *Gene*. 2013;527(1):26-32.
 23. Brunet Vega A, Pericay C, Moya I, Ferrer A, Dotor E, Pisa A, et al. microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncology reports*. 2013;30(1):320-6.
 24. Xu XH, Wu XB, Wu SB, Liu HB, Chen R, Li Y. Identification of miRNAs differentially expressed in clinical stages of human colorectal carcinoma-an investigation in Guangzhou, China. *PloS one*. 2014;9(4):e94060.
 25. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular cancer*. 2009;8:102.
 26. Li HG, Zhao LH, Bao XB, Sun PC, Zhai BP. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2014;18(14):2048-57.

27. Ma L, Weinberg RA. MicroRNAs in malignant progression. *Cell cycle*. 2008;7(5):570-2.
28. Estimativa do câncer para 2016: [www.http//inca.gov.br](http://inca.gov.br); 2016 [26/12/2016].
29. Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol*. 2002;8(1):21-5.
30. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.
31. DeVita VT LT, Rosenberg SA *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Edition t, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins2014.
32. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, Group EGW. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25 Suppl 3:iii1-9.
33. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
34. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*.17(6):1471-4.
35. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, Loconte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-medicare data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.29(33):4401-9.
36. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart A. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end results and rectal pooled analysis outcomes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.28(2):256-63.
37. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.28(2):264-71.
38. Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, Wolmark N, O'Connell MJ, Begovic M, et al. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(10):1785-96.

39. Lee S, Hofmann LJ, Davis KG, Waddell BE. Lymph node evaluation of colon cancer and its association with improved staging and survival in the Department of Defense Health Care System. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(11):3080-6.
40. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(5):503-7.
41. Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, Haller DG, Gray R, Benedetti J, et al. End points for colon cancer adjuvant trials: observations and recommendations based on individual patient data from 20,898 patients enrolled onto 18 randomized trials from the ACCENT Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(29):4569-74.
42. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(6):872-7.
43. Poultsides GA, Servais EL, Saltz LB, Patil S, Kemeny NE, Guillem JG, et al. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(20):3379-84.
44. Fahy BN, D'Angelica M, DeMatteo RP, Blumgart LH, Weiser MR, Ostrovnaya I, et al. Synchronous hepatic metastases from colon cancer: changing treatment strategies and results of surgical intervention. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(2):361-70.
45. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg*. 2004;240(4):644-57; discussion 57-8.
46. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(22):3677-83.
47. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(3):374-9.
48. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(1):98-9.
49. Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin J, Cervantes A, Ciardiello F, et al. Molecular markers and biological targeted therapies in metastatic colorectal

cancer: expert opinion and recommendations derived from the 11th ESMO/World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2009. *Ann Oncol*.21 Suppl 6:vi1-10.

50. Kapiteijn E, Putter H, van de Velde CJ. Impact of the introduction and training of total mesorectal excision on recurrence and survival in rectal cancer in The Netherlands. *Br J Surg*. 2002;89(9):1142-9.
51. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2002;45(5):628-34.
52. NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *Jama*. 1990;264(11):1444-50.
53. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *Jama*. 2012;307(13):1383-93.
54. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julie C, Zaanen A, Tabernero J, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(12):2378-85.
55. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(8):862-73.
56. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Lopa SH, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(3):359-64.
57. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(12):1225-33.
58. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015;148(1):88-99.
59. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(28):3768-74.
60. Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant

treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(19):3109-16.

61. Quasar Collaborative G, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370(9604):2020-9.
62. Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, Ye X, Lee M, Friedman PN, et al. Biologic determinants of tumor recurrence in stage II colon cancer: validation study of the 12-gene recurrence score in cancer and leukemia group B (CALGB) 9581. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(14):1775-81.
63. Di Narzo AF, Tejpar S, Rossi S, Yan P, Popovici V, Wirapati P, et al. Test of four colon cancer risk-scores in formalin fixed paraffin embedded microarray gene expression data. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(10).
64. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
65. Khattak MA, Martin H, Davidson A, Phillips M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clinical colorectal cancer*. 2015;14(2):81-90.
66. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
67. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D68-73.
68. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D152-7.
69. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
70. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(9):2999-3004.
71. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2004;39(2):167-9.

72. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of pathology*. 2005;207(2):243-9.
73. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(6):3183-9.
74. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*. 2006;9(3):189-98.
75. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-52.
76. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2257-61.
77. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10513-8.
78. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008;18(10):997-1006.
79. Browse miRBase by species 2015 [cited 2015 27/06/2015].
80. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D154-8.
81. Goel A, Boland CR. Recent insights into the pathogenesis of colorectal cancer. *Current opinion in gastroenterology*. 2010;26(1):47-52.
82. Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *J Intern Med*. 2008;263(4):366-75.
83. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch*. 2008;452(1):1-10.
84. Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5B):1811-9.
85. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1-12.
86. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert opinion on biological therapy*. 2007;7(7):1009-19.

87. Kuller LH, Bracken MB, Ogino S, Prentice RL, Tracy RP. The role of epidemiology in the era of molecular epidemiology and genomics: Summary of the 2013 AJE-sponsored Society of Epidemiologic Research Symposium. *American journal of epidemiology*. 2013;178(9):1350-4.
88. Lumbreras B, Parker LA, Porta M, Pollan M, Ioannidis JP, Hernandez-Aguado I. Overinterpretation of clinical applicability in molecular diagnostic research. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):786-94.
89. Farooqi AA, Qureshi MZ, Coskunpinar E, Naqvi SK, Yaylim I, Ismail M. MiR-421, miR-155 and miR-650: emerging trends of regulation of cancer and apoptosis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(5):1909-12.
90. Yi B, Piazza GA, Su X, Xi Y. MicroRNA and cancer chemoprevention. *Cancer prevention research*. 2013;6(5):401-9.
91. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
92. Nair VS, Pritchard CC, Tewari M, Ioannidis JP. Design and Analysis for Studying microRNAs in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *American journal of epidemiology*. 2014;180(2):140-52.
93. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development*. 2001;15(20):2654-9.
94. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):102-14.
95. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular cancer research : MCR*. 2003;1(12):882-91.
96. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Disease markers*. 2009;26(1):27-34.
97. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(5):903-6.
98. Fang WJ, Lin CZ, Zhang HH, Qian J, Zhong L, Xu N. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China. *The Journal of international medical research*. 2007;35(5):716-23.
99. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially

expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular cancer*. 2006;5:29.

100. Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, Pilpel Y, Ju J. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(7 Pt 1):2014-24.
101. Yang L, Belaguli N, Berger DH. MicroRNA and colorectal cancer. *World journal of surgery*. 2009;33(4):638-46.
102. Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzini G, Lazzarini G, et al. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Experimental cell research*. 2009;315(8):1439-47.
103. Slattery ML, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, Milash B, Wolff RK. MicroRNAs and colon and rectal cancer: differential expression by tumor location and subtype. *Genes Chromosomes Cancer*. 50(3):196-206.
104. Lin M, Chen W, Huang J, Gao H, Ye Y, Song Z, et al. MicroRNA expression profiles in human colorectal cancers with liver metastases. *Oncol Rep*. 25(3):739-47.
105. Xing J, Wan S, Zhou F, Qu F, Li B, Myers RE, et al. Genetic polymorphisms in pre-microRNA genes as prognostic markers of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012;21(1):217-27.
106. Koga Y, Yasunaga M, Takahashi A, Kuroda J, Moriya Y, Akasu T, et al. MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening. *Cancer prevention research*. 2010;3(11):1435-42.
107. Wu CW, Ng SS, Dong YJ, Ng SC, Leung WW, Lee CW, et al. Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps. *Gut*. 2012;61(5):739-45.
108. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(1):39-53.
109. La Rocca G, Badin M, Shi B, Xu SQ, Deangelis T, Sepp-Lorenzino L, et al. Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway. *Journal of cellular physiology*. 2009;220(2):485-91.
110. Alvarez-Diaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, Lombardia L, Herrera M, Dominguez O, et al. MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Human molecular genetics*. 2012;21(10):2157-65.
111. Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, Asangani IA, Kumarswamy R, Nelson LD, et al. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Bioscience reports*. 2011;31(3):185-97.

112. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Valeri N, Stevens J, Caan BJ, et al. An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;137(2):428-38.
113. Wang W, Li F, Mao Y, Zhou H, Sun J, Li R, et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Human genetics*. 2013;132(6):641-8.
114. Christensen LL, Tobiasen H, Holm A, Schepeler T, Ostensfeld MS, Thorsen K, et al. MiRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;133(1):67-78.
115. Young LE, Moore AE, Sokol L, Meisner-Kober N, Dixon DA. The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10(1):167-80.
116. Qian J, Jiang B, Li M, Chen J, Fang M. Prognostic significance of microRNA-16 expression in human colorectal cancer. *World journal of surgery*. 2013;37(12):2944-9.
117. Ma Q, Wang X, Li Z, Li B, Ma F, Peng L, et al. microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. *Oncology reports*. 2013;29(4):1652-8.
118. Cui X, Witalison EE, Chumanevich AP, Chumanevich AA, Poudyal D, Subramanian V, et al. The induction of microRNA-16 in colon cancer cells by protein arginine deiminase inhibition causes a p53-dependent cell cycle arrest. *PloS one*. 2013;8(1):e53791.
119. Sun K, Deng HJ, Lei ST, Dong JQ, Li GX. miRNA-338-3p suppresses cell growth of human colorectal carcinoma by targeting smoothened. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(14):2197-207.
120. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Sokilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome--microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(18):4919-30.
121. Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N, et al. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. *The oncologist*. 2012;17(6):823-9.
122. Kjersem JB, Ikdahl T, Guren T, Skovlund E, Sorbye H, Hamfjord J, et al. Let-7 miRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR; colorectal cancer screening population prevalence and influence on clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin +/- cetuximab. *BMC cancer*. 2012;12:534.

123. Smits KM, Paranjape T, Nallur S, Wouters KA, Weijnenberg MP, Schouten LJ, et al. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(24):7723-31.
124. Salendo J, Spitzner M, Kramer F, Zhang X, Jo P, Wolff HA, et al. Identification of a microRNA expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells, involving miRNAs-320a, -224, -132 and let7g. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2013;108(3):451-7.
125. Xu L, Zhang Y, Wang H, Zhang G, Ding Y, Zhao L. Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway. *Journal of translational medicine*. 2014;12:244.
126. Wu X, Li S, Xu X, Wu S, Chen R, Jiang Q, et al. The potential value of miR-1 and miR-374b as biomarkers for colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(3):2840-51.
127. Han C, Zhou Y, An Q, Li F, Li D, Zhang X, et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
128. Chen WS, Leung CM, Pan HW, Hu LY, Li SC, Ho MR, et al. Silencing of miR-1-1 and miR-133a-2 cluster expression by DNA hypermethylation in colorectal cancer. *Oncology reports*. 2012;28(3):1069-76.
129. Reid JF, Sokolova V, Zoni E, Lampis A, Pizzamiglio S, Bertan C, et al. miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10(4):504-15.
130. Ma Y, Zhang P, Wang F, Zhang H, Yang J, Peng J, et al. miR-150 as a potential biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer. *Gut*. 2012;61(10):1447-53.
131. Feng J, Yang Y, Zhang P, Wang F, Ma Y, Qin H, et al. miR-150 functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting c-Myb. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(10):2125-34.
132. Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S, Biasiolo M, Faccioli A, Perilli L, et al. Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis. *BMC genomics*. 2013;14:589.
133. Gattolliat CH, Uguen A, Pesson M, Trillet K, Simon B, Doucet L, et al. MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *European journal of cancer*. 2015;51(3):409-20.

134. Zhou T, Zhang GJ, Zhou H, Xiao HX, Li Y. Overexpression of microRNA-183 in human colorectal cancer and its clinical significance. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2014;26(2):229-33.
135. Earle JS, Luthra R, Romans A, Abraham R, Ensor J, Yao H, et al. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010;12(4):433-40.
136. Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. Down-regulation of NDRG2 gene expression in human colorectal cancer involves promoter methylation and microRNA-650. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;406(4):534-8.
137. Wang S, Hu J, Zhang D, Li J, Fei Q, Sun Y. Prognostic role of microRNA-31 in various cancers: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(11):11639-45.
138. Xu RS, Wu XD, Zhang SQ, Li CF, Yang L, Li DD, et al. The tumor suppressor gene RhoBTB1 is a novel target of miR-31 in human colon cancer. *International journal of oncology*. 2013;42(2):676-82.
139. Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, Zhu J, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(13):9508-18.
140. Schee K, Boye K, Abrahamsen TW, Fodstad O, Flatmark K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC cancer*. 2012;12:505.
141. Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, et al. Association of MicroRNA-31-5p with Clinical Efficacy of Anti-EGFR Therapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology*. 2014.
142. Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, et al. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014;35(4):776-83.
143. Laurila EM, Kallioniemi A. The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes, chromosomes & cancer*. 2013;52(12):1103-13.
144. Cekaite L, Rantala JK, Bruun J, Guriby M, Agesen TH, Danielsen SA, et al. MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. *Neoplasia*. 2012;14(9):868-79.
145. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D140-4.

146. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
147. Vyas S, Kumaranayake L. Constructing socio-economic status indices: how to use principal components analysis. *Health policy and planning*. 2006;21(6):459-68.
148. Wilcox RR. Robust principal components: a generalized variance perspective. *Behavior research methods*. 2008;40(1):102-8.
149. Slattery ML, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, Milash B, Wolff RK. MicroRNAs and colon and rectal cancer: differential expression by tumor location and subtype. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011;50(3):196-206.
150. Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W, et al. 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncology reports*. 2010;23(1):121-8.
151. Huynh KT, Hoon DS. Epigenetics of regional lymph node metastasis in solid tumors. *Clinical & experimental metastasis*. 2012;29(7):747-56.
152. Dambal S, Shah M, Mihelich B, Nonn L. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic acids research*. 2015;43(15):7173-88.
153. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International journal of oncology*. 2009;34(4):1069-75.
154. Zhang X, Zhu W, Zhang J, Huo S, Zhou L, Gu Z, et al. MicroRNA-650 targets ING4 to promote gastric cancer tumorigenicity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;395(2):275-80.

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na Inclusão dos tecidos no Banco de Tumores

Banco Material Biológico Humano

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste projeto é coletar e armazenar por tempo indeterminado uma parte de tecido que será retirado durante a cirurgia e um pouco de outros materiais biológicos como sangue e afins para realização de pesquisas futuras. Seu material ficará armazenado no laboratório de Biologia Tumoral da PUC-RS, por tempo indeterminado, para que no futuro sejam realizadas análises para verificar elementos característicos dos tecidos através de novos projetos de pesquisa, devidamente aprovados pelo Comitê Científico e Comitê de Ética e Pesquisa desta Instituição.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Vamos precisar de sua autorização para armazenar uma parte de seu tecido retirado durante a cirurgia e possivelmente coletar uma amostra de qualquer outro material biológico conforme seu médico achar necessário.

RISCOS E DESCONFORTOS

O procedimento cirúrgico ocorreria independente deste projeto, o que não acarretaria em um risco adicional, estamos apenas solicitando sua permissão para armazenar e utilizar no futuro uma parte deste material.

Caso seu médico ache necessário e você permitir, ocorrerá a coleta de outro material biológico durante ou após o procedimento cirúrgico. Os riscos desta coleta serão avaliados e explicados pelo seu médico antes do procedimento.

BENEFÍCIOS

Você não obterá benefício pessoal através deste projeto. Porém os dados das pesquisas futuras realizadas com seu material poderão auxiliar novos estudos.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua autorização para coleta e armazenamento de seu material para este projeto é voluntária. Você pode optar por não autorizar a coleta ou desistir a qualquer momento que seu material seja guardado no laboratório. Neste último caso seu material será devidamente destruído conforme sua solicitação. Não há nenhuma forma de compensação financeira (ou outra) por sua participação no projeto. Garantimos que sua autorização ou não para as coletas não influenciará em nada qualquer modificação no tratamento e atenção proposto por seu médico assistente.

Qualquer dúvida quanto a este trabalho, tanto por sua parte, como de qualquer familiar, será prontamente fornecida por um dos membros da equipe envolvido neste projeto.

CONFIDENCIALIDADE

Você tem direito à privacidade e toda informação de identificação colhida para este projeto será confidencial até os limites permitidos por lei. Seu registro médico permanecerá confidencial podendo se necessário ser consultado anonimamente por autoridades legalmente reconhecidas, ou por indivíduos que trabalhem diretamente neste estudo, observando o devido sigilo profissional.

Para qualquer pergunta sobre os direitos como participante deste estudo ou se você tiver novas perguntas poderá entrar em contato com o pesquisador responsável:
Dr. Bernardo Garicochea

No telefone: 51-3320.3000 ramal 2177

CONSENTIMENTO

Este documento foi aprovado pelo **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUC**, o qual é o responsável por assegurar que os direitos humanos sejam protegidos.

Eu _____ li as informações acima e entendi o conteúdo deste termo e o objetivo da coleta do material, bem como os possíveis riscos e benefícios de minha participação. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram ouvidas e respondidas. Ao assinar este documento eu dou meu consentimento livre e esclarecido para que seja coletado e armazenado meu material biológico neste estudo. Declaro também que recebi uma cópia do presente Termo de Consentimento.

_____/_____/_____
Nome do Paciente Assinatura do Paciente Data

_____/_____/_____
Nome do Representante Legal Assinatura Data

Eu abaixo assinado, expliquei este estudo detalhadamente para o paciente identificado acima (e/ou seu representante legal) e darei uma cópia assinada e datada deste documento para o mesmo.

_____/_____/_____
Nome do Investigador Assinatura do Investigador Data

Anexo B – Carta de Confirmação do Estudo ao Programa de Pós-Graduação



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE E MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto Alegre, 15 de fevereiro de 2016.

A
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde
N/Faculdade

Prezada Coordenadora:

Confirmo a realização da defesa de tese intitulada **EXPRESSION DE MICRORNAS EM AMOSTRAS TUMORAIS E LINFONODAIS DE CÂNCER COLORRETAL** da Pós-Graduanda **CRISTIANE RIOS PETRARCA** no dia 18 de março de 2016, às 8h 30min na sala 310 do PPG.

Informo que o Artigo foi submetido para publicação na Revista **NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE** com fator de impacto **55.873**.

Para os membros da comissão examinadora confirmo os seguintes professores:

1. **Dr. HENRIQUE SARUBBI FILLMANN**- (FAMED/PUCRS)

e-mail: henrique.fillmann@pucrs.br

Fone:

Endereço para entrega:

2. **Dr. ANTONIO FABIANO FERREIRA** (externo ao programa) – (OncoSinoS)

e-mail:

Fone: 51-33464102

Endereço para entrega: Rua Mostardeiros, 291 conj 408 POA

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3320-3318 – Fax (51) 3320-3316

E-mail: medicina-pg@pucrs.br

www.pucrs.br/medicina



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE E MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

3. **Dra. RAFAELLA PETRACO** – (PUCRS)
E-mail: rafaella@fertilitat.com.br
Fone:
Endereço para entrega: **CENTRO CLÍNICO – HSL-PUCRS COJ.801**

4. **Dra SHEILA S. FERREIRA** – (PUCRS)
E-mail: sheila-ferreira@saude.rs.gov.br
Fone:
Endereço para entrega: **SERVIÇO DE ONCOLOGIA-HSL-PUCRS – 2ºANDAR SALA 228.03**

5. **Dr ALEXANDRE VONTOBEL PADOIN** Suplente – (PPGMCS/PUCRS)
E-mail: alexandre.padoin@pucrs.br
Fone:
Endereço para entrega: PPGMCS/PUCRS

Atenciosamente.

Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva
Orientador

Porto Alegre, 15 de fevereiro de 2016.

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3320-3318 – Fax (51) 3320-3316

E-mail: medicina-pg@pucrs.br

www.pucrs.br/medicina

Anexo C – Ficha Clínica para Coleta de Dados -

0778374376	PROTOCOLO COLORRETAL	
PRONTUÁRIO	IDADE DIAG	
NOME		
SEXO	COR PELE	História Familiar
<input type="radio"/> FEMININO	<input type="radio"/> Branca	<input type="radio"/> Sim
<input type="radio"/> MASCULINO	<input type="radio"/> Parda	<input type="radio"/> Não
	<input type="radio"/> Outra	<input type="radio"/> Sind Genética não determ
		<input type="radio"/> NA
DATA DIAGNÓSTICO	CEA Pre-Op.	
Tipo Histológico		
Classif. Risco	T <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	EC
<input type="radio"/> íleo-cecal	<input type="checkbox"/> Fígado	
<input type="radio"/> Direito	<input type="checkbox"/> Pulmão	
<input type="radio"/> Transverso	<input type="checkbox"/> Carcinomat	
<input type="radio"/> NA	<input type="checkbox"/> Ossos	
<input type="radio"/> Esquerdo	<input type="checkbox"/> Não	
	<input type="checkbox"/> NA	
QTX Adjuvante	Esquema QTX	
<input type="checkbox"/> Não indicada	<input type="checkbox"/> FOLFOX	
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> 5FU+LV	
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> XELOX	
	<input type="checkbox"/> XELODA	
	<input type="checkbox"/> NA	
Recorrência	DATA RECORRÊNCIA	Local recidiva
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> Não		
<input type="checkbox"/> NA		
	LINHAS QTX	
ÓBITO	DATA ÓBITO	Motivo óbito
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> Sim		
<input type="checkbox"/> NA		

Anexo D – Confirmação da Submissão do Artigo

From: **Rodrigo Kraft Rovere** <rodrigovere@hotmail.com>
Date: 2016-02-15 1:26 GMT-02:00
Subject: FW: New England Journal of Medicine - 16-02196
To: "crispetrarca@gmail.com" <crispetrarca@gmail.com>, Cris Petrarca <crispetrarca@bol.com.br>

> Date: Sun, 14 Feb 2016 22:23:54 -0500
> From: editorial@nejm.org
> To: rodrigovere@hotmail.com
> Subject: New England Journal of Medicine - 16-02196
>
> Dear Dr. Rovere and co-authors,
>
> Thank you for submitting your manuscript, "MicroRNAs : prognostic markers and predictors of colorectal cancer" to the New England Journal of Medicine.
>
> Your manuscript has been forwarded to members of our editorial staff, who will make an initial evaluation and decide whether it merits further consideration. You will be notified of the decision as soon as possible.
>
> Your manuscript ID is 16-02196.
>
> Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc05.manuscriptcentral.com/nejm> and edit your user information as appropriate. You may also view the status of your manuscript at any time by checking For Authors section of the site.
>
> We are undertaking evaluation of your manuscript with the understanding that neither the substance of the article nor the figures or tables have been published or will be submitted for publication elsewhere during the period of review.
>
> Please provide the editors with copies of other manuscripts by you or your coauthors addressing similar or related research questions that are in preparation or under consideration at other journals. This does not apply to abstracts published in connection with scientific meetings or to news reports based on presentations at such meetings.
>
> The Journal's policy is explained more fully at <http://www.nejm.org/page/author-center/editorial-policies>.
>
> Please call us at [617-734-9800](tel:617-734-9800) if you have any questions.
>
> Sincerely,
>
> Jeffrey M. Drazen, M.D.
> Editor-in-Chief
> New England Journal of Medicine
> Distinguished Parker B. Francis Professor of Medicine
> Harvard Medical School
>
> New England Journal of Medicine
> 10 Shattuck Street
> Boston, MA 02115
> [\(617\) 734-9800](tel:617-734-9800)
> Fax: [\(617\) 739-9864](tel:617-739-9864)
> <http://www.nejm.org>

Anexo E – Artigo Submetido

MICRORNAS: PROGNOSTIC MARKERS AND PREDICTORS OF COLORECTAL CANCER

Petrarca, C.R., Silva, V.D.; Andrade, R.V., Rovere, R.K., Fillmann, H.S. and Garicochea, B.

SUMMARY

Introduction : Recent evidence attest to the molecular heterogeneity in colorectal cancer at different levels of expression and especially in post-transcriptional gene regulation. One of the agents involved in this regulation are the small RNAs noncoding (microRNAs). Changes in them have been linked to diagnosis, prognosis , gene expression , chemosensitivity and staging , are considered potential biomarkers.

Methods: Analysis of differential expression of microRNAs mir-570, mir-16, mir-338, let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650 and mir-31 by qPCR in tumor samples and lymph node of patients diagnosed with colorectal cancer. Samples were taken from colorectal cancer tumor bank's Hospital Oncology Service São Lucas - PUCRS - Porto Alegre – Brazil, clinicopathological data collected from September 2002 to October 2011 are included.

Results: The mean age of the 28 patients studied was 66.7 years (26 to 86) with mean follow-up of 3.9 years (0 to 9), SD = 2.8 and a median of four years. The expression of repressed mir570 was associated with mortality when evaluated in the primary tumor (N = 28), 63.64% vs. 17.65%, p = 0.020. In primary tumors of patients with lymph node metastasis (N = 15) median expression mir183 it was 4.42 whereas in the samples from patients with no lymph nodes patients (N = 13) median expression of miR183 was 54.17, p = 0.01, suggesting localized disease at diagnosis. In the subgroup of patients with lymph node metastasis (N = 15) to mir650 expression was suppressed in 25% of cases with recurrence and overexpressed in 85% of cases, with p = 0.04 and is associated with prevalence of relapse.

Conclusions: The expression pattern of miRNAs differs depending on primary site of the studied disease (primary tumor or metastatic disease). The expression of repressed mir570 in the primary tumor was predictor of mortality. Overexpression of mir183 the primary tumor suggests localized disease at diagnosis. The overexpression of mir650 in metastatic lymph node recurrence predictor . Thus, the present data generated on miRNA expression levels in tumors and lymph nodes in patients with colorectal cancer their high degree of involvement in the development and progression of cancer due to their activity on the regulation of expression of proteins encoded by oncogenes, makes these molecules promising candidates for distinguishing different subtypes of tumors and tumors as well as to predict its behaviour.

Keywords : microRNA , differential expression , colorectal cancer biomarker

INTRODUCTION

Colorectal cancer is the third most common cancer in men and the second in women worldwide. An estimated 746,000 cases in men worldwide, 10% of all malignancies in women cases and 614,000, corresponding to 9.2% of cancers in this population (1).

Approximately 25% of patients present with distant metastases at diagnosis, and 50% will develop metastasis. The overall 5-year survival for patients diagnosed with colorectal cancer is 60% (2)

Despite the improvement in preventive and therapeutic measures, the incidence of colorectal cancer has not declined substantially in recent decades, and is even on the rise in population at a rapid pace of economic growth (1).

The best option for the treatment of colorectal cancer has been intensely discussed in recent years, but still depends largely on surgical staging. The understanding that the number of lymph nodes examined by the pathologist is one of the most important prognostic factors (3-

5). The prognosis of patients with colorectal cancer has improved in recent decades at the expense of earlier diagnosis and more effective treatments. The average survival of patients with advanced RCC was 10 to 12 months was exclusively when therapy with 5-fluorouracil for more than 24 months when the schemes added oxaliplatin or irinotecan and anti-EGFR monoclonal antibodies and anti-VEGF. A better understanding of via RAS (HRAS, KRAS and NRAS) and their use for therapeutic setting also provided better results in patients with advanced RCC, but without benefit to other staging (6, 7).

Genomic signatures also validated as OncotypeDX colon cancer (8), ColoPrint, Veridex and GeneFxCOLON (3, 9) are useful tools for identifying the prognosis of cases, but also of little use in clinical practice. Change to little clinical practice given Beherder not many centers have access to these tests

MiRNAs are small RNAs with 19-25 nucleotide non-coding (10). They are able to regulate gene expression at post-transcriptional level through the repression of translation or degradation of mRNA target molecules (11, 12).

The mechanisms responsible for changes in the expression of miRNAs in cancer are many. Perhaps the function of miRNAs in malignant neoplasms undergo changes by the same mechanisms by which affect the expression of genes that encode proteins (epigenetic alterations or mutations in the DNA sequence) (12). They have been implicated in most major cellular functions such as proliferation, differentiation, apoptosis, stress response and transcriptional regulation. A single miRNA can regulate several different target genes (11, 20-23).

The location of miRNA genes in the genome fragile sites and the variations in the expression of these molecules in various malignancies provide circumstantial evidence for the involvement of the same in tumorigenesis. Thus miRNAs are important in maintaining balance between oncogenes and tumor suppressor genes (22, 24-27).

The altered expression of microRNAs have been reported in colorectal cancer, being associated with diagnosis, prognosis and chemosensitivity, staging, gene expression and degree of malignancy (32-43).

Among the many educational opportunities with miRNAs were selected miRNAs mir-570, mir-16, mir-338, let-7, mir-1, mir-150, mir-183, mir-650 and mir-31, and in view of its association with colorectal tumors, but not been studied in relation to lymph node metastasis and clinicopathologic features of colorectal cancer.

METHODS

POPULATION AND SAMPLE

A total of 28 samples viable .de primary tumor and lymph node metastasis of colorectal cancer tumor bank's Hospital Oncology Service São Lucas - PUCRS with date of diagnosis from September 2002 to October 2011.

Older patients were included 18 years of age with histopathological diagnosis of colorectal cancer underwent surgical resection of the primary tumor and were excluded all patients who had one or more of the conditions listed below: prior chemotherapy, prior radiotherapy of the abdomen or pelvis, diagnosis of previous or other concomitant cancer.

The gender, skin colour, age at diagnosis, date of diagnosis / biopsy, tumor location, stage at diagnosis (TNM), time to disease progression in months, defined as the time elapsed between diagnosis and recurrence of disease and vital status at the end of the study and / or follow-up were analysed.

One retrospective cohort study with contemporary components to determine the occurrence of clinical outcomes in patients.

The expression of miRNAs in primary tumors of colorectal cancer and regional lymph nodes were analyzed by qPCR. The samples were stored in RNAlater and / or liquid nitrogen, stored

at both -80°C . The mirVana kit (Ambion, USA) was used to extract miRNA tissue according to the manufacturer's recommendations.

The quantification of miRNA was performed by qPCR using TaqMan system (Applied Biosystems , Foster City , USA) using the TaqMan MicroRNA Assay kit (Applied Biosystems) . The reaction by real-time PCR was performed using the StepOnePlus System Real-Time PCR machine (Applied Biosystems , USA) according to manufacturer's recommendations . For this work the mir -570 , mir -16 , mir -338 , let -7 , mir -1 , mir -150 , mir -183 , mir -650 , mir -31 were analyzed and as an endogenous control was used "small RNU -6B RNA . " (14, 52)

Relative quantification (RQ) of the miRNA was determined using the comparative method $\Delta\Delta\text{Cq}$. (Add a reference as it is made the analysis) .

STATISTICAL ANALYSIS

Stata software, version 11.2 was used. For a description of numeric variables, mean and standard deviation (SD) or median and interquartil interval (CI) , along with the amplitude . For a description of categorical variables, absolute and relative frequency, statistical tests used were the Fisher exact test (for categorical variables) or non- parametric Wilcoxon test and Kruskal Wallis (for numeric variables) .

The miRNAs variables were evaluated as continuous initially and in a second time as categorical. Expressions were considered < 1 underexpressed and > 1 as overexpressed .

The crossing between the different expressions of RNA was done by Spearman correlation .

It was considered the 5 % significance level for two-tailed tests.

RESULTS

Data collected from medical records of 28 patients characterize the sample in terms of age, gender, initial staging, skin color, anatomical site of the tumor, recurrence, follow-up and vital status, as described in Table 1.

All tumor samples are primary colon or rectal adenocarcinoma.

The date of diagnosis ranged from 09/27/2005 to 07/26/2011, unnecessary information follow-up time ranged from 0 to 9 years with a mean = 3.9 (SD = 2.8), with a median of 4 years.

The clinical data is summarised in the table below. Dos 11 cases (36.6%) relapsed, and the interval to recurrence ranged from 1 to 42 months, mean = 14.6 months (SD = 13.8), with median of 9 months.

At the end of follow-up 17 (60.7%) were alive and 10 (35.7) were killed with 1 (3.6%) ignored.

As the cause of death 60% (6 patients) were due to cancer progression, 40% (4 patients) not related to disease progression and 1 patient was not the cause of death identified.

Table 1: Clinicopathologic features of the cases studied .

	Age	Gender	TNM	Clinical stage	Colour	Primary tumour	Recurrence (months)	Follow up (years)	Overall survival
1	77	F	T3N0M0	IIA	B	COLON	NO	5	A
2	81	M	T3N2bM0	IIIB	B	COLON	7	3	A
3	67	M	T3N1bM0	IIIB	B	RECTAL	NO	5	A
4	78	M	T3N1aM1a	IVA	B	COLON	NO	0,3	D
5	83	M	T4aN2bM0	IIIC	B	RECTAL	10	1	D
6	84	F	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	NO	8	A
7	80	M	T3N1bMx	IIIB	B	RECTAL	2	0,5	D
8	83	M	T3N2bM0	IIIC	NB	COLON	NO	4	A
9	52	M	T3N0M0	IIA	B	COLON	8	2	D
10	76	M	T3N1M0	IIIB	B	COLON	NO	7	A
11	53	M	T1N0M0	I	B	COLON	NO	7	A
12	86	F	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	36	4	A
13	65	M	T3N0M0	IIA	B	COLON	42	8	A
14	60	M	T3N1aMx	IIIB	B	COLON	NO	6	A
15	46	F	T3N0M0	IIA	B	COLON	NO	7	A
16	70	F	T4aN1aM1	IV	B	COLON	6	2	D
17	70	M	T4aN0M0	IIB	B	COLON	NO	7	A
18	77	F	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	*	*	*
19	80	M	T4aN0Mx	IIB	B	COLON	NÃO	3	A
20	67	M	T4aN1bMx	IIIC	B	COLON	NÃO	0,1	D
21	59	F	T4aN1bM0	IIIB	B	COLON	11	1	D
22	59	M	T3N2bM1	IV	B	COLON	12	1	D
23	26	F	T3N2bM0	IIIC	NB	COLON	26	1	D
24	60	F	T3N0M1	IV	B	COLON	NÃO	2	A
25	38	F	T3N2aM0	IIIB	B	COLON	NÃO	4	A
26	80	M	T4aN0M0	IIB	B	COLON	NÃO	0,6	D
27	30	F	T3N1bM0	IIIB	NB	COLON	NÃO	4	A
28	82	F	T3N0M0	IIA	B	COLON	NÃO	4	A

Age in years

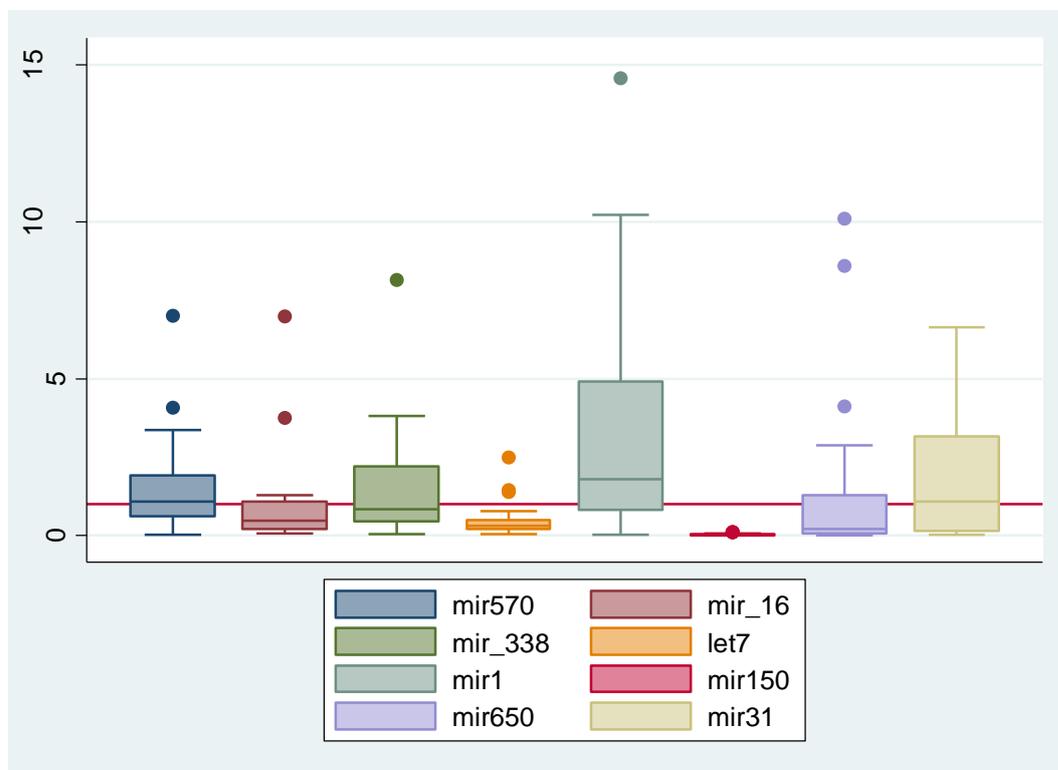
GENDER- F=female M=male

VS=vital status A alive D dead

The pattern of expression of miRNAs were studied in the tumor samples compared to the lymph node, n = 28 .

The distribution of cases according to the expression of miRNAs , except the mir -183 with aberrant expression in relation to the other studied miRNAs , is presented in Figure 1 , where it can be seen that all expressions tend to overexpression .

Figure 1: Expression of miRNAs in the primary tumour, excluding aberrant values



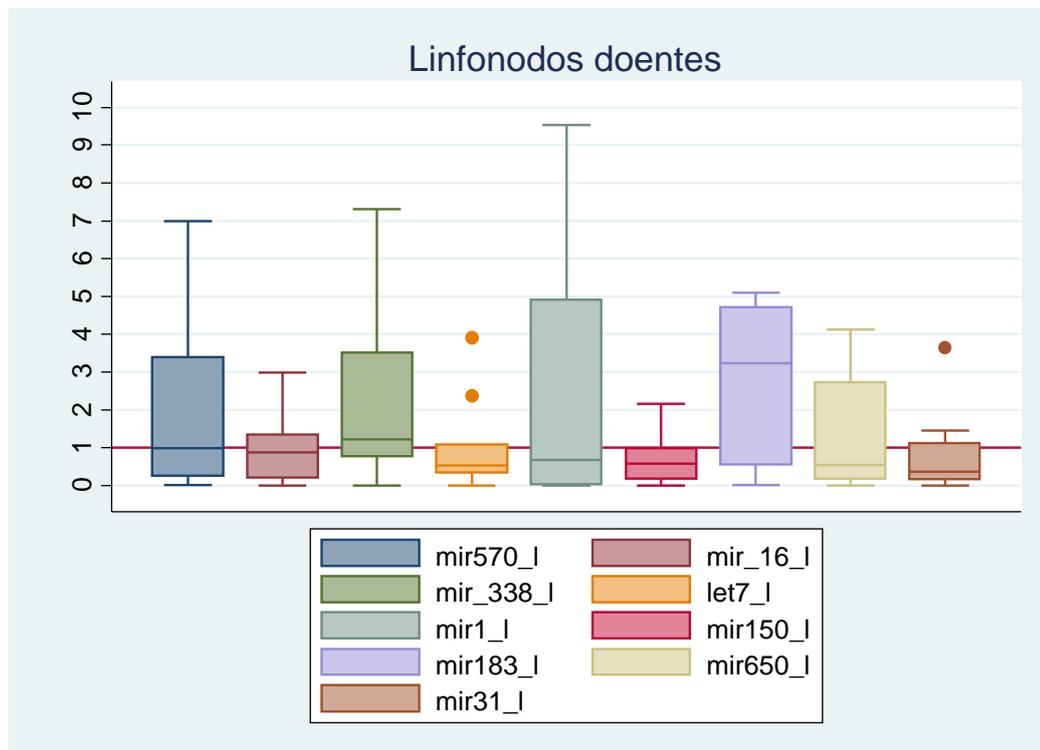
Excluded: mir-1>100 (n=3) e mir-31>30 (n=3), totalising N=22.

An analysis of the subset of cases with lymph node involvement , N = 15 , which was evaluated the expression of miRNAs in metastatic lymph node compared to standard.

The average mir -570 expression in metastatic lymph nodes was 1.61 (0.02 to 6.99) , mir -16 1.43 (0-6,79) , mir -338 5.49 (0-38 , 79) , LET7 1.28 (0 to 5.52) , mir -1 5.78 (0-55,68) , mir -150 0.57 (0-2,16) , mir -183 39 (0 , 01-449) , mir -650 1.19 (0-4,13) and mir -31 1.16 (0-4,87).

The distribution of the sample of metastatic lymph nodes compared the expression of miRNAs is shown in Figure 2. You can see that there is a greater variation in the expression of miRNAs where mir -570 , mir -338 , mir -1 , mir -183 and mir -650 overexpression and mir -31 , mir -150 , mir -16 Let7 and the expression repressed. Or are super or underexpressed !

Figure 2: Expression of miRNAs in the sample of metastatic lymph nodes



ASSOCIATIONS

Dichotomizing variables miRNA, were two statistically significant associations with the miRNA mir-570 and mir-183.

The prevalence of death in individuals with suppressed expression (less than 1) of the mir-570 in the primary tumor was 63.64% and those overexpressed (greater than 1) was 17.65%, with p value Fisher's exact test 0.020.

By comparing the expression of mir-183 on primary tumor of patients with lymph node metastasis versus the expression in the primary tumor in the lymph nodes of patients free of disease, it is seen that this miRNA is overexpressed in tumors with lymph nodes without the disease.

In the group with lymph node involvement (15 patients) the median expression of mir-183 was 4.42 with interquartile range 1.66 p25 and p75 43.01; while in the group without lymph node involvement (13 patients) the median expression of mir-183 was 54.17 with interquartile range p25 and p75 of 13.12 to 223.14. With p 0.01 the Wilcoxon test. For this analysis we excluded the number 20 case with aberrant expressions.

When comparing the occurrence of death in relation to lymph node status (metastatic or not) there was a higher incidence of death in patients with lymph node group (53.33%) than in the group with normal lymph nodes (15.38%), with association borderline, $p = 0.055$.

All patients who died due to cancer (6 patients) had metastatic lymph nodes, with less follow-up in relation to the others ($p = 0.03$).

The higher the stage, the higher the occurrence of death (0, 18, 42 and 75% for stage I, II, III and IV, respectively), noticing a dose-response gradient in predicting mortality, but with value P. 0.16.

Patients with higher miRNAs values tended to die more by causes other than cancer. Of the 3 patients studied who died from other causes, two of them (67%) belonged to the group with

the highest expression of miRNA. Since the two groups of patients with lower expression of miRNA who died, they were caused cancer progression. With $p = 0.17$.

In the subgroup of patients with diseased lymph nodes (metastatic), $N = 15$, where we evaluated the expression of miRNAs in patients lymph nodes in relation normal lymph node , the expression of mir -650 was suppressed in 25% of cases with recurrence and overexpressed in 85 % of cases, with $p = 0.04$, associated with the prevalence of recurrence.

separately analyzing the subgroup of patients with lymph node metastasis (15 patients) compared the expression of miRNAs in the primary tumor (in relation to its node) and node patient (compared to normal lymph node) , a negative correlation is observed for most microRNAs . This correlation reaches -0.73 to -0.67 mir - 183 and mir -16 to .

In other cases there was no correlation , but no case the correlation was positive . This means that higher values in a group of smaller echo values in the other and vice versa.

DISCUSSION

MiRNAs emerge as a new possibility in the interpretation of heterogeneous disease behavior such as cancer (35). Future studies should bring new possibilities and associations of early diagnosis and screening, better definition of the prognosis and therapy and in the treatment of diseases miRNAs manipulation.

So of the 150 selected cases, 28 were selected by presenting them here established selection criteria.

The fact that the sample is little difficult statistically significant associations. It is possible only when the variable studied presents a big difference in being present or not. So we can not identify associations that exist, but otherwise spend the associations found to be of great interest.

As the clinical and pathological characteristics of the sample, you can see that follow the pattern of the studied pathology as the distribution by age, gender, tumor site, stage and histology. Thus, in spite of the small sample is representative of the pathology in question. Confirming this reasoning, the occurrence of death was higher in patients with metastatic lymph nodes as well as the follow-up period was lower, with borderline association. The 6 patients who had the cause of death cancer patients had lymph nodes. It is a fact that lymph node involvement is the main prognostic factor in colorectal cancer. We conclude that the data is found in accordance with this standard pathology and the association was borderline because the sample is small.

The expression pattern of miRNAs in the primary tumor compared to their lymph node is directed to overexpression.

The pattern of expression of miRNAs studied in patient lymph nodes showed different directions while maintaining the standard of overexpression for mir-570, mir-338, mir-1, mir-183 and mir-31 but suppressed in the mir-16, Let7, mir miR-650 and -150.

Confirming this finding, the factor variable created to represent the expression of miRNAs had power when we analyzed the expression in the primary tumor, where all the expressions are the same direction (overexpression). That is, individuals with higher values of a miRNA tended to have higher values for the others as well.

Since the factor variable created to represent the expression of miRNAs of metastatic lymph nodes showed no power to do so, since the expressions here are not always in the same direction, where some miRNAs were negative correlation. That is, patients with the highest expression were lower for some expressions to another, such as mir-183 and mir-150 with a negative correlation -0.23.

Thus we may conclude that nodes in patients studied the expression of miRNAs is more heterogeneous (different senses of association), and this primary tumor expression pattern is more homogeneous.

Corroborating the heterogeneity of these findings, Slattery et al described different expressions miRNA depending on the location, subtype, genetic syndrome or inflammatory bowel disease, showing the expression of miRNAs not always follows a tissue pattern, but a characteristic of the detected disease (91) . Zhou et AL showed that the pattern of expression of miRNAs can be modified by exposure to chemotherapy (92). Huynt et al reviewed the importance of studying epigenetic aberrations in malignancies nodes such as colorectal cancer, in view of their potential utility as a biomarker, which may be different in other tissues (93).

These data suggest that the interpretation of miRNAs found in studies with the tissue sample is very relevant as well as the miRNA in question. Perhaps in colorectal cancer, information of affected lymph nodes is more representative of the primary tumor.

Christensen et al described four miRNAs, including mir-570, which when overexpressed in colorectal cancer showed association with recurrence compared to patients without recurrence (59).

In gastric cancer, the overexpression of miR-570 was associated with the degree of differentiation, and tumor invasion and lymph node metastasis possibly by inhibiting translation of B7-H1 protein. Indicating that the mir-570 may influence protein expression and modifying tissue susceptibility to cancer and its progression (58).

In this study, the repressed expression of mir-570 in the primary tumor was associated with death. Thus, it is assumed that this miRNA is expected death predictor when evaluated in the primary tumor of colorectal cancer. This finding is similar to the findings reported in the literature.

MiR-183 is commonly overexpressed in RCC samples compared to normal tissue and its action is through inhibition of tumor suppressor genes (38, 80, 94, 95). mir-183 overexpression is associated with advanced stage colorectal cancer, lymph node metastasis and the distance and worse prognosis. And therefore, a biomarker of poor prognosis (79). In this study, the greatest expression of mir-183 on primary tumor suggests localized disease at diagnosis, distinct from the data reported so far. However, we do not know if the initial disease increases the expression or lower expression causes the disease has greater power to metastasize. It is possible that this discrepancy is due to heterogeneity of eestádios studies using different tumor tissues, and location techniques.

The overexpression of the mir-650 is associated with lymph node metastasis and the distance of CCR. N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) is a tumor suppressor gene. It is present in normal tissues and virtually undetectable in various cancers. Feng L, et al demonstrated that this gene in colorectal cancer are suppressed when in the presence of miR-650. This suggests that this miRNA is a direct regulator of gene expression in colorectal cancer (81).

Xueli Zhang and colleagues described the overexpression of the mir-650 in gastric cancer by promoting proliferation and lymph node metastasis and the distance (96).

In this study, the patient lymph node of colorectal cancer, overexpression of the mir-650 was associated with relapse. Corroborating the literature data.

However, this association has not been established in the cancer tissue in the intestine.

Perhaps the evaluation of this miRNA is more important in the lymph node than in the primary tumor to predict recurrence, since there was no association identified in the expression of miRNA in the analysis of the primary tumor.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

The identification of miRNA expression and its association with clinicopathological data and course of the disease increases the understanding of the complex mechanism for the formation and evolution of diseases such as cancer.

From these data it is possible to develop diagnostic and prognostic tests.

The ability to evaluate miRNAs in serum / plasma / stool provides great advantage over tissue / biopsy / surgical supplies, there is the need for validation of expression in non tissue samples and development of appropriate techniques. So called liquid biopsies Avoiding the need of repeated tissue biopsies

From the identification of the expression of miRNAs is fundamental to develop studies on functional analysis of these miRNAs. So you can check whether the increased expression or silencing of these miRNAs in cell cultures are able to inhibit or promote cell growth, confirming the findings of the initial studies.

For each potential biomarker is necessary to identify the molecular function and disrupting mechanism which supports the clinical use and enable therapeutic targets.

epigenetic signature may be considered, using a combination of expression of different miRNAs, it could minimize the discrepancy found between studies.

The accumulation of information about miRNAs and the proper interpretation of these findings will be crucial for them to become more effective markers can improve the understanding of the disease and the development of possible therapeutic targets (foreseen-long awaited) epigenetic therapy.

REFERENCES

1. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [26/6/2015].
2. DeVita VT LT, Rosenberg SA Cancer: Principles & Practice of Oncology. Edition t, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins2014.
3. Dienstmann R, Salazar R, Taberero J. Personalizing Colon Cancer Adjuvant Therapy: Selecting Optimal Treatments for Individual Patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(16):1787-96.
4. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 6:vi64-72.
5. Glimelius B, Tiret E, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 6:vi81-8.
6. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
7. Khattak MA, Martin H, Davidson A, Phillips M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clinical colorectal cancer*. 2015;14(2):81-90.
8. Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, Ye X, Lee M, Friedman PN, et al. Biologic determinants of tumor recurrence in stage II colon cancer: validation study of the 12-gene recurrence score in cancer and leukemia group B (CALGB) 9581. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(14):1775-81.
9. Di Narzo AF, Tejpar S, Rossi S, Yan P, Popovici V, Wirapati P, et al. Test of four colon cancer risk-scores in formalin fixed paraffin embedded microarray gene expression data. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(10).
10. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
11. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011;51:25-43.
12. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *Apmis*. 2007;115(10):1090-106.
13. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
14. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D68-73.
15. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D152-7.
16. Browse miRBase by species 2015 [cited 2015 27/06/2015].
17. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D154-8.
18. Goel A, Boland CR. Recent insights into the pathogenesis of colorectal cancer. *Current opinion in gastroenterology*. 2010;26(1):47-52.

19. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
20. Kozomara A, Hunt S, Ninova M, Griffiths-Jones S, Ronshaugen M. Target repression induced by endogenous microRNAs: large differences, small effects. *PloS one*. 2014;9(8):e104286.
21. Lu J, Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome research*. 2012;22(7):1243-54.
22. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*. 2007;171(3):728-38.
23. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):259-69.
24. Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *J Intern Med*. 2008;263(4):366-75.
25. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch*. 2008;452(1):1-10.
26. Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5B):1811-9.
27. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1-12.
28. Kuller LH, Bracken MB, Ogino S, Prentice RL, Tracy RP. The role of epidemiology in the era of molecular epidemiology and genomics: Summary of the 2013 AJE-sponsored Society of Epidemiologic Research Symposium. *American journal of epidemiology*. 2013;178(9):1350-4.
29. Lumbreras B, Parker LA, Porta M, Pollan M, Ioannidis JP, Hernandez-Aguado I. Overinterpretation of clinical applicability in molecular diagnostic research. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):786-94.
30. Farooqi AA, Qureshi MZ, Coskunpinar E, Naqvi SK, Yaylim I, Ismail M. MiR-421, miR-155 and miR-650: emerging trends of regulation of cancer and apoptosis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(5):1909-12.
31. Yi B, Piazza GA, Su X, Xi Y. MicroRNA and cancer chemoprevention. *Cancer prevention research*. 2013;6(5):401-9.
32. Dong Y, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer management and research*. 2014;6:405-22.
33. Della Vittoria Scarpati G, Calura E, Di Marino M, Romualdi C, Beltrame L, Malapelle U, et al. Analysis of differential miRNA expression in primary tumor and stroma of colorectal cancer patients. *BioMed research international*. 2014;2014:840921.
34. Schee K, Fodstad O, Flatmark K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer. *The American journal of pathology*. 2010;177(4):1592-9.
35. Wang F, Wong SC, Chan LW, Cho WC, Yip SP, Yung BY. Multiple regression analysis of mRNA-miRNA associations in colorectal cancer pathway. *BioMed research international*. 2014;2014:676724.
36. Wang CJ, Stratmann J, Zhou ZG, Sun XF. Suppression of microRNA-31 increases sensitivity to 5-FU at an early stage, and affects cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *BMC cancer*. 2010;10:616.
37. Zhang JX, Song W, Chen ZH, Wei JH, Liao YJ, Lei J, et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis. *The Lancet Oncology*. 2013;14(13):1295-306.
38. Zhang QH, Sun HM, Zheng RZ, Li YC, Zhang Q, Cheng P, et al. Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. *Gene*. 2013;527(1):26-32.

39. Brunet Vega A, Pericay C, Moya I, Ferrer A, Dotor E, Pisa A, et al. microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncology reports*. 2013;30(1):320-6.
40. Xu XH, Wu XB, Wu SB, Liu HB, Chen R, Li Y. Identification of miRNAs differentially expressed in clinical stages of human colorectal carcinoma-an investigation in Guangzhou, China. *PloS one*. 2014;9(4):e94060.
41. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular cancer*. 2009;8:102.
42. Li HG, Zhao LH, Bao XB, Sun PC, Zhai BP. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2014;18(14):2048-57.
43. Ma L, Weinberg RA. MicroRNAs in malignant progression. *Cell cycle*. 2008;7(5):570-2.
44. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular cancer research : MCR*. 2003;1(12):882-91.
45. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers*. 2009;26(1):27-34.
46. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(5):903-6.
47. Fang WJ, Lin CZ, Zhang HH, Qian J, Zhong L, Xu N. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China. *The Journal of international medical research*. 2007;35(5):716-23.
48. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular cancer*. 2006;5:29.
49. Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, Pilpel Y, Ju J. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(7 Pt 1):2014-24.
50. Yang L, Belaguli N, Berger DH. MicroRNA and colorectal cancer. *World journal of surgery*. 2009;33(4):638-46.
51. Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzini G, Lazzarini G, et al. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Experimental cell research*. 2009;315(8):1439-47.
52. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D140-4.
53. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
54. Nair VS, Pritchard CC, Tewari M, Ioannidis JP. Design and Analysis for Studying microRNAs in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *American journal of epidemiology*. 2014;180(2):140-52.
55. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development*. 2001;15(20):2654-9.

56. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):102-14.
57. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Valeri N, Stevens J, Caan BJ, et al. An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;137(2):428-38.
58. Wang W, Li F, Mao Y, Zhou H, Sun J, Li R, et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Human genetics*. 2013;132(6):641-8.
59. Christensen LL, Tobiasen H, Holm A, Schepeler T, Ostensfeld MS, Thorsen K, et al. MiRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;133(1):67-78.
60. Young LE, Moore AE, Sokol L, Meisner-Kober N, Dixon DA. The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10(1):167-80.
61. Qian J, Jiang B, Li M, Chen J, Fang M. Prognostic significance of microRNA-16 expression in human colorectal cancer. *World journal of surgery*. 2013;37(12):2944-9.
62. Ma Q, Wang X, Li Z, Li B, Ma F, Peng L, et al. microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. *Oncology reports*. 2013;29(4):1652-8.
63. Cui X, Witalison EE, Chumanovich AP, Chumanovich AA, Poudyal D, Subramanian V, et al. The induction of microRNA-16 in colon cancer cells by protein arginine deiminase inhibition causes a p53-dependent cell cycle arrest. *PloS one*. 2013;8(1):e53791.
64. Sun K, Deng HJ, Lei ST, Dong JQ, Li GX. miRNA-338-3p suppresses cell growth of human colorectal carcinoma by targeting smoothened. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(14):2197-207.
65. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Sokilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome--microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(18):4919-30.
66. Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N, et al. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. *The oncologist*. 2012;17(6):823-9.
67. Kjersem JB, Ikdahl T, Guren T, Skovlund E, Sorbye H, Hamfjord J, et al. Let-7 miRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR; colorectal cancer screening population prevalence and influence on clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin +/- cetuximab. *BMC cancer*. 2012;12:534.
68. Smits KM, Paranjape T, Nallur S, Wouters KA, Weijenberg MP, Schouten LJ, et al. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(24):7723-31.
69. Salendo J, Spitzner M, Kramer F, Zhang X, Jo P, Wolff HA, et al. Identification of a microRNA expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells, involving miRNAs-320a, -224, -132 and let7g. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2013;108(3):451-7.
70. Xu L, Zhang Y, Wang H, Zhang G, Ding Y, Zhao L. Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway. *Journal of translational medicine*. 2014;12:244.

71. Wu X, Li S, Xu X, Wu S, Chen R, Jiang Q, et al. The potential value of miR-1 and miR-374b as biomarkers for colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(3):2840-51.
72. Han C, Zhou Y, An Q, Li F, Li D, Zhang X, et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
73. Chen WS, Leung CM, Pan HW, Hu LY, Li SC, Ho MR, et al. Silencing of miR-1-1 and miR-133a-2 cluster expression by DNA hypermethylation in colorectal cancer. *Oncology reports*. 2012;28(3):1069-76.
74. Reid JF, Sokolova V, Zoni E, Lampis A, Pizzamiglio S, Bertan C, et al. miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10(4):504-15.
75. Ma Y, Zhang P, Wang F, Zhang H, Yang J, Peng J, et al. miR-150 as a potential biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer. *Gut*. 2012;61(10):1447-53.
76. Feng J, Yang Y, Zhang P, Wang F, Ma Y, Qin H, et al. miR-150 functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting c-Myb. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(10):2125-34.
77. Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S, Biasiolo M, Faccioli A, Perilli L, et al. Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis. *BMC genomics*. 2013;14:589.
78. Gattolliat CH, Uguen A, Pesson M, Trillet K, Simon B, Doucet L, et al. MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *European journal of cancer*. 2015;51(3):409-20.
79. Zhou T, Zhang GJ, Zhou H, Xiao HX, Li Y. Overexpression of microRNA-183 in human colorectal cancer and its clinical significance. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2014;26(2):229-33.
80. Earle JS, Luthra R, Romans A, Abraham R, Ensor J, Yao H, et al. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010;12(4):433-40.
81. Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. Down-regulation of NDRG2 gene expression in human colorectal cancer involves promoter methylation and microRNA-650. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;406(4):534-8.
82. Wang S, Hu J, Zhang D, Li J, Fei Q, Sun Y. Prognostic role of microRNA-31 in various cancers: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(11):11639-45.
83. Xu RS, Wu XD, Zhang SQ, Li CF, Yang L, Li DD, et al. The tumor suppressor gene RhoBTB1 is a novel target of miR-31 in human colon cancer. *International journal of oncology*. 2013;42(2):676-82.
84. Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, Zhu J, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(13):9508-18.
85. Schee K, Boye K, Abrahamsen TW, Fodstad O, Flatmark K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC cancer*. 2012;12:505.
86. Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, et al. Association of MicroRNA-31-5p with Clinical Efficacy of Anti-EGFR Therapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology*. 2014.

87. Noshō K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, et al. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014;35(4):776-83.
88. Laurila EM, Kallioniemi A. The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes, chromosomes & cancer*. 2013;52(12):1103-13.
89. Cekaite L, Rantala JK, Bruun J, Guriby M, Agesen TH, Danielsen SA, et al. MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. *Neoplasia*. 2012;14(9):868-79.
90. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
91. Slattery ML, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, Milash B, Wolff RK. MicroRNAs and colon and rectal cancer: differential expression by tumor location and subtype. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011;50(3):196-206.
92. Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W, et al. 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncology reports*. 2010;23(1):121-8.
93. Huynh KT, Hoon DS. Epigenetics of regional lymph node metastasis in solid tumors. *Clinical & experimental metastasis*. 2012;29(7):747-56.
94. Dambal S, Shah M, Mihelich B, Nonn L. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic acids research*. 2015;43(15):7173-88.
95. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International journal of oncology*. 2009;34(4):1069-75.
96. Zhang X, Zhu W, Zhang J, Huo S, Zhou L, Gu Z, et al. MicroRNA-650 targets ING4 to promote gastric cancer tumorigenicity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;395(2):275-80.