



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

Cristiano de Pádua Souza

**“Perfil de expressão de microRNAs e seus alvos
moleculares em carcinoma pulmonar”**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Câmpus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia, Área: Biologia Molecular e Genética Aplicadas à Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, Cristiano de Pádua.

Perfil de expressão de microRNAs e seus alvos
moleculares em carcinoma pulmonar / Cristiano de Pádua
Souza. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Patrícia Pintor dos Reis

Capes: 40101045

1. Pulmões - Câncer. 2. MicroRNAs. 3. Biomarcadores.
4. Sobrevida.

Palavras-chave: Alvos moleculares; Biomarcadores
prognósticos; NSCLC; microRNAs.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

Aos meus pais, **Pedro Emídio de Souza** e **Nami Martins de Pádua Souza**, primeiros a lançarem as sementes do respeito e da educação, sempre me ensinando os valores e os princípios que conduzem a minha vida. O amor de vocês me fortalece e me dá segurança para seguir em frente! Tudo o que sou e conquisto, devo a vocês!

A minha esposa **Beatriz Helena Borges Lustosa**, “...luz aos meus olhos e chão aos meus pés...”, pela nobreza de caráter, sempre companheira, compreensiva e estimuladora dos meus sonhos. Te amo!

Ao meu irmão, **Pedro Henrique de Souza**, companheiro e cúmplice da minha caminhada, sempre me apoiando nas minhas decisões com muito carinho.

Aos meus avós, tios e primos que, mesmo de longe, sempre torceram por mim.

Agradecimentos Especiais

Ao mestre **Jesus** por me dar força interior para superar as dificuldades da vida, mostrando sempre os melhores caminhos a seguir nas horas incertas.

A Prof(a) Dra **Patrícia Pintor dos Reis**, pela fonte de inspiração, pela competência na orientação, dedicação, paciência, por acreditar na minha capacidade, pelos valiosos ensinamentos e por me colocar em um caminho, até então desconhecido, e que hoje sou apaixonado. Você foi fundamental no meu crescimento científico e profissional.

A Dra **Adriane Feijó**, pela dedicação, colaboração, participação, empenho e ensinamento junto a este projeto.

As amigas **Tainara, Nayara e Natália**, pela participação, auxílio no desenvolvimento e esclarecimentos de dúvidas junto a este projeto. Vocês foram fundamentais para a condução e conclusão do mesmo.

Aos amigos **Orlando Pereira Rodrigues Júnior, Elenize Jamas e Filipe Jamas**, pela amizade acima de tudo, pela cumplicidade, pelo exemplo de família e pelo acolhimento durante toda jornada.

Lista de Abreviaturas

AdenoCa	Adenocarcinoma
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
ANKK1	<i>ankyrin repeat and kinase domain containing 1</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>Area under the curve</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEC/SCC	Carcinoma de células escamosas, do inglês <i>Squamous Cell Carcinoma</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLL	Leucemia Linfocítica Crônica
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DDR1	<i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 1</i>
DDR2	<i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 2</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EML4	<i>Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4</i>
EPHA3	<i>EPH receptor A3</i>
EPHA5	<i>EPH receptor A5</i>
ERBB	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
FFPE	Fixado(a) em formalina e embebido(a) em parafina
FGFR1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FGFR2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
FGFR4	<i>fibroblast growth factor receptor 4</i>
GNAS	<i>GNAS complex locus</i>
HCV	Vírus da hepatite C
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
Hsa	Homo sapiens
IC	Intervalo de confiança
INHBA	<i>inhibin beta A</i>

<i>KDR</i>	<i>kinase insert domain receptor</i>
<i>KEAP1</i>	<i>kelch like ECH associated protein 1</i>
<i>KEGG</i>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog p53</i>
<i>LRP1B</i>	<i>LDL receptor related protein 1B</i>
<i>LTK</i>	<i>leukocyte receptor tyrosine kinase</i>
<i>MAP2K4/JNKK</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
<i>MEK-1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
<i>MET</i>	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
miR/miRNA	microRNA
mirDiP	<i>microRNA Data Integration Portal</i>
mRNA	RNA mensageiro
<i>mTOR/FGFR3</i>	<i>mechanistic target of rapamycin/ fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>NEK10</i>	<i>NIMA-related kinase 10</i>
<i>NFE2L2</i>	nuclear factor, erythroid 2 like 2
<i>NF1</i>	<i>neurofibromin 1</i>
<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
<i>NSCLC</i>	Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas, do inglês <i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
<i>NTRK1</i>	<i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1</i>
<i>NTRK3</i>	<i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3</i>
p value	Valor de p
<i>PAK3</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3</i>
<i>PDGFRA</i>	<i>platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>
<i>PI3K</i>	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
Pré-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	Transcrito primário longo de microRNA
<i>PRKDC</i>	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>
<i>PTPRD</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, D</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>RB</i>	Retinoblastoma
<i>RET</i>	<i>ret proto-oncogene</i>
<i>RISC</i>	Complexo indutor de silenciamento de RNA, do inglês <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>

RNA(s)	Ácido Ribonucleico
ROC	Curva ROC, do inglês <i>Receiver Operator Characteristic Curve</i>
<i>ROS-1</i>	<i>ROS proto-oncogene 1 , receptor tyrosine kinase</i>
RQ	Quantificação relativa
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SCLC	Carcinoma Pulmonar de Células Pequenas, do inglês <i>Small Cell Lung Cancer</i>
<i>SLC38A3</i>	<i>Solute carrier family 38, member 3</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SOX2	SRY (<i>sex determining region Y</i>)-box 2
SPSS	Programa de Análise Estatística, do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<i>STK11</i>	<i>serine/threonine kinase 11</i>
<i>STK11/LKB1</i>	<i>serine/threonine kinase 11</i>
TCGA	Atlas Genômico do Câncer, do inglês <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TK	Tirosina Kinase
TLDA	<i>TaqMan Array Human MicroRNA Cards</i>
<i>TP53</i>	Proteína supressora tumoral TP53
<i>TRPM6</i>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6</i>
<i>TTN</i>	<i>Titin</i>
UTR	Região não traduzida
<i>ZMYND10/BLU</i>	<i>Zinc finger, MYND-type containing 10</i>

Resumo

Perfil de expressão de microRNAs e seus alvos moleculares em carcinoma pulmonar

Introdução: O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo. Apesar dos avanços nas estratégias de diagnóstico e o desenvolvimento de novas terapias com alvos moleculares, pouco progresso tem sido observado quanto ao aumento de sobrevida dos pacientes. Portanto, a identificação de novos biomarcadores ainda é necessária para o desenvolvimento de novas terapêuticas para carcinomas pulmonares. Nesse contexto, os microRNAs (miRNAs) são moléculas promissoras, pois constituem uma classe de RNAs não-codantes reguladores da expressão gênica os quais têm sido evidenciados como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos no câncer. **Materiais e Métodos:** Amostras de tecido pulmonar tumoral e normal de 38 pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas (da sigla em inglês NSCLC), dos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, foram avaliadas para a expressão global de miRNAs utilizando a plataforma *TaqMan® Array Human MicroRNA card A v3.0* (Life Technologies). Os miRNAs com alterações na expressão ($FC \geq 2,0$) e $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados de expressão foram associados com a sobrevida global. Análises de bioinformática permitiram identificar genes-alvo regulados pelos miRNAs desregulados. A relação entre sobrevida global e a identificação de uma assinatura de expressão de miRNAs foi avaliada com objetivo de integrar nossos achados utilizando bancos de dados públicos. **Resultados:** Os resultados mostraram que 33 miRNAs estavam com expressão significativamente aumentada ou diminuída ($FC \geq 2,0$ e $p < 0,05$) nos tumores comparado aos tecidos pulmonares histologicamente normais. Diversas correlações estatísticas foram observadas, sendo que 8/33 miRNAs desregulados (miR-20a, miR-20b, miR-93-5p, miR-205, miR-374-5p, miR-376, miR-708 e miR-196b) estavam diferencialmente expressos entre os subtipos histológicos de adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas. Os miRNAs miR-20a e miR-93 estavam diferencialmente expressos em tumores de pacientes tabagistas vs. não-tabagistas. A expressão diminuída dos miR-15a e miR-411 e a expressão aumentada dos miR-25, miR-205 e miR-196b estavam significativamente associadas ($p < 0,05$) com pior sobrevida dos pacientes. **Conclusões:** Os miRNAs miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b e miR-411 podem constituir candidatos a biomarcadores prognósticos em NSCLC. Nossos dados podem contribuir para o desenvolvimento de estudos de validação utilizando um grande número de pacientes.

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Qualificação do problema, dados de incidência e fatores de risco associados ao desenvolvimento de carcinomas pulmonares	17
1.2. Tratamento dos carcinomas pulmonares (CPNPC).....	19
1.3. Genética dos carcinomas pulmonares.....	20
1.4. MicroRNAs (miRNAs).....	23
1.5. MicroRNAs: aplicação terapêutica potencial.....	26
1.6. MicroRNAs em Câncer de Pulmão.....	27
1.7. MicroRNAs e alvos moleculares terapêuticos em câncer de pulmão.	28
2. Justificativa	31
3. Objetivos	33
4. Materiais e métodos	35
4.1. Considerações éticas.....	36
4.2. Critérios de inclusão e exclusão.....	36
4.3. Delineamento experimental.....	37
4.4. Dados demográficos, fatores de risco e dados anatomopatológicos.	37
4.5. Extração do RNA.....	38
4.6. Quantificação de microRNAs.....	38
4.7. Análise estatística dos dados.....	39
4.8. Análise bioinformática dos dados.....	40
5. Resultados	42
5.1. Objetivo 1. Determinar o perfil de expressão global de microRNAs em NSCLC dos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas.....	43
5.1.1. Análise dos controles endógenos.....	43
5.1.2. Amostras controle.....	44
5.1.3. Expressão desregulada de miRNAs em NSCLC.....	44

5.2. Objetivo 2. Correlacionar as alterações na expressão de miRNAs com a sobrevida global e sobrevida livre de doença dos pacientes com NSCLC, ajustados aos dados demográficos, fatores de risco, dados clínicos e histopatológicos.....	47
5.2.1. Dados demográficos, fatores de risco e dados anatomopatológicos.....	47
5.2.2. Kaplan Meier.....	52
5.3. Objetivo 3. Aplicar estratégias de análise de bioinformática e identificação de genes-alvo preditos a serem regulados pelos miRNAs alterados.....	55
5.4. Objetivo 4. Integrar os dados de expressão de miRNAs com dados da literatura (TCGA), seus genes-alvo preditos e identificar vias moleculares potencialmente associadas ao desenvolvimento e progressão de NSCLC.....	58
6. Discussão.....	60
7. Referências bibliográficas.....	65
8. Apêndices.....	82
9. Anexo.....	93

1. Introdução

1.1 Qualificação do problema, dados de incidência e fatores de risco associados ao desenvolvimento de carcinomas pulmonares:

O câncer de pulmão é um dos cânceres mais comuns e a principal causa de morte por câncer no mundo. Aproximadamente 1,6 milhões de casos novos são diagnosticados por ano no mundo, representando 12,7% de todos os casos novos de câncer e a sua incidência vem aumentando em aproximadamente 2% ao ano (1-3).

Em países desenvolvidos como os EUA, estima-se que ocorreram 221.200 casos novos com 158.040 mortes por carcinoma pulmonar em 2014 (4). Do total de casos novos esperados, 115.660 ocorreram em homens, com 86.380 mortes, e 105.590 ocorreram em mulheres, com 71.660 mortes (4). No Brasil, em 2014, esperava-se mais de 27.000 novos casos, sendo que aproximadamente 16.400 seriam em homens e mais de 10.930 em mulheres (5). Estes valores correspondem a um risco estimado de 22,94 casos novos a cada 100 mil homens e 11,83 a cada 100 mil mulheres (5). Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o Câncer de Pulmão é o segundo mais frequente nas regiões Sul (33,6/100 mil) e Centro-Oeste (14,03/100 mil) do Brasil (5). Nas regiões Sudeste (18,5/100 mil), Nordeste (9,01/100 mil) e Norte (5,11/100 mil), este câncer ocupa a terceira posição entre os mais frequentes (5).

O tabagismo é o principal fator de risco, estando associado como fator etiológico da doença em 85% dos casos (6). Além disso, 10 a 15% dos fumantes irão desenvolver carcinoma pulmonar durante a vida. A fumaça do cigarro é uma complexa mistura de aproximadamente 4.000 substâncias, sendo que mais de 100 são carcinogênicas, tais como a Beta-naftilamina, o Benzeno, o Polônio 210, o Dibenzopireno e o Dibenzocarbazol (7, 8).

Comparados com indivíduos não fumantes, os tabagistas têm um risco cerca de 20-30 vezes maior de desenvolver câncer de pulmão (9). Normalmente os homens apresentam maiores taxas de incidência desta neoplasia por constituírem o gênero mais exposto ao tabagismo (9). Entre as mulheres, as Chinesas apresentam a maior taxa de incidência mundial para esse tipo de

câncer. Portanto, medidas de prevenção antitabagismo são extremamente importantes para diminuir a incidência desta neoplasia (10).

Existem outros importantes fatores de risco para o câncer de pulmão, tais como a exposição à carcinógenos ocupacionais e ambientais, como, por exemplo, o asbesto, o arsênico, o gás radônio, o níquel, o cádmio, o berílio, a sílica e a poluição do ar (11, 12). O asbesto é um carcinógeno conhecido por aumentar a incidência de câncer de pulmão em pessoas expostas à inalação de fibras de amianto, principalmente em indivíduos que também fumam, sendo responsável por 3 a 4% dos casos (13). Com relação aos outros carcinógenos ocupacionais, estima-se que aproximadamente 5 a 10% dos casos de carcinoma pulmonar sejam atribuídos a esse tipo de exposição em países industrializados (10).

Os carcinomas pulmonares compreendem dois tipos principais: os de células não pequenas (da sigla em inglês NSCLC – *Non Small Cell Lung Cancer*) e os de células pequenas (da sigla em inglês SCLC – *Small Cell Lung Cancer*) (3). Os NSCLC são os mais comuns correspondendo a aproximadamente 85% dos casos e os SCLC representando aproximadamente 15% dos casos. Os NSCLC podem ser divididos em três tipos histológicos principais: adenocarcinoma (AdenoCa), carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas (da sigla em inglês SCC, *Squamous Cell Carcinoma*) e carcinoma de grandes células (da sigla em inglês, LCC, *Large Cell Carcinoma*) (3). O AdenoCa é o tipo mais comum, principalmente em mulheres não-tabagistas, seguido do SCC e do LCC (3). Adicionalmente, uma classificação histológica recente dos adenocarcinomas foi proposta para determinar o padrão histológico predominante nos adenocarcinomas invasivos: sólido, lepidico, acinar, papilar ou micropapilar, sendo que esse último tem sido associado a um pior prognóstico (14, 15).

O adenocarcinoma de pulmão corresponde ao subtipo histológico mais comum de NSCLC (40% dos casos) e é um problema de saúde pública mundial, representando a maior causa de morte por câncer no mundo (16, 17). Devido à imensa heterogeneidade de vários aspectos (patologia, molecular, clínica, radiologia e cirurgia) observada em pacientes com adenocarcinoma de pulmão, o desenvolvimento de tratamentos mais precisos, bem como de biomarcadores prognósticos e preditivos ainda representa um enorme desafio. Na última década,

vários marcadores moleculares e modelos têm sido propostos ou desenvolvidos no âmbito de um específico subgrupo de NSCLC. Em particular, a identificação de mutações no *EGFR* e linfoma anaplásico quinase (*ALK*), introduziu uma nova era de terapia alvo em AdenoCa (18, 19). A possibilidade de escolha do tratamento e acompanhamento de pacientes resultou, com base na análise de mutações, em outros alvos como o *Her2*, *PIK3CA*, *BRAF*, *NUTM1*, *MET*, *ROS1*, *FGFR1*, *KRAS* e *PTEN* que também podem ter um potencial poderoso no tratamento clínico destes pacientes (20-22).

1.2. Tratamento dos carcinomas pulmonares de células não pequenas

As principais formas de tratamento para pacientes diagnosticados com NSCLC consistem em cirurgia, quimioterapia, radioterapia e, mais recentemente, terapias com alvos moleculares. Apesar dos avanços nos métodos de detecção ou *screening*, técnicas minimamente invasivas para diagnóstico e tratamento (incluindo radioterapia extereotóxica e terapias-alvo), o diagnóstico, na prática clínica, é realizado na maioria dos casos em uma fase tardia da doença. Assim, observa-se uma sobrevida de aproximadamente 16,8% dos pacientes em 5 anos após o diagnóstico (23).

Adicionalmente, apenas 15% dos pacientes com carcinoma pulmonar são diagnosticados com a doença localizada apenas no sítio primário e em 22% dos casos a doença já acomete linfonodos regionais (metástase regional). Em 57% dos pacientes, a doença já se encontra em fase metastática à distância. Existem ainda 6% dos casos em que o estadiamento da doença é indeterminado (23).

A cirurgia é o tratamento que aumenta a chance de cura e com melhor impacto na sobrevida em 5 anos, variando de 45 a 65%, sendo que em pacientes com doença localizada e não candidatos a cirurgia, devido a co-morbidades ou recusa ao procedimento cirúrgico, a sobrevida diminui para 6% (24). Em pacientes com doença metastática à distância, a qual acomete, na maioria das vezes, o cérebro e os ossos, a sobrevida em 5 anos é de 4%, independente da realização de quimioterapia, radioterapia ou terapia-alvo com inibidores Tirosina-

Quinase (da sigla em inglês TK – *Tyrosine Kinase*). Nesses pacientes, o tratamento sistêmico tem intenção paliativa (23).

Os esquemas de quimioterapia mais comumente usados para tratamento de doença avançada são esquemas combinados de quimioterapia como, por exemplo, Paclitaxel e Carboplatina ou Cisplatina, Gencitabina e Carboplatina ou Cisplatina, Etoposídeo e Carboplatina ou Cisplatina e Vinorelbina e Carboplatina ou Cisplatina (25-27), e a indicação de um ou de outro esquema de tratamento depende das condições clínicas do paciente.

Com a descoberta de mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (da sigla em inglês *EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor*) em 2004 (28), drogas contendo como alvo molecular o *EGFR* foram desenvolvidas, como os inibidores TK, Gefitinibe (29), Erlotinibe (30) e Afatinibe (31). Os pacientes elegíveis para o uso dessas drogas são aqueles com tumores contendo mutações no domínio TK do *EGFR*. Os resultados do uso desses medicamentos mostraram impacto na sobrevida livre de progressão de doença e melhora da qualidade de vida, quando comparado com quimioterapia convencional, porém sem impacto na sobrevida global (28-31).

Em 2007, a identificação da fusão dos oncogenes *ALK* e *EML4* em carcinomas pulmonares sem mutações em *EGFR* (32) mostrou ser um alvo terapêutico e um marcador preditivo de resposta a um novo inibidor TK conhecido como Crizotinibe, porém resistentes ao Erlotinibe e ao Gefitinibe (33).

1.3. Genética dos carcinomas pulmonares

Os mecanismos de tumorigênese pulmonar incluem mutações ativadoras de genes codificadores de fatores de crescimento, tais como os proto-oncogenes *K-RAS* (34, 35), *EGFR* (36), *BRAF*, *MEK-1*, *HER2*, *MET* (37) e rearranjos do gene *ALK* (38, 39), bem como mutações inativadoras de genes supressores tumorais como o *TP53* e *PTEN* (40).

Mutações somáticas no gene supressor tumoral *TP53* ocorrem em aproximadamente 50% dos NSCLC (dos subtipos histológicos AdenoCa e SCC),

acometendo pacientes em idade mais avançada e geralmente associadas ao tabagismo (3, 41).

Mutações no proto-oncogene *K-RAS* são observadas em 25-40% dos tumores de pacientes com adenocarcinoma pulmonar e frequentemente associadas a um pior prognóstico (42). Existem diferenças na prevalência de mutações no *K-RAS*, com uma maior incidência em tumores pulmonares de pacientes da população Ocidental, principalmente em homens tabagistas, comparado com pacientes da população Oriental (43). Por outro lado, as mutações no gene *K-RAS* não são comuns em outros tipos histológicos de NSCLC, como o SCC, além de serem relatadas em 0 a 15% dos pacientes não tabagistas (42, 44-46).

As mutações no gene *EGFR* são encontradas em aproximadamente 15 a 40% das neoplasias pulmonares do subtipo AdenoCa e ocorrem com maior frequência em mulheres, na sua maioria de origem Asiática, que nunca fumaram ou ex-tabagistas, sendo rara a sua ocorrência em tumores do subtipo histológico SCC (47). A prevalência das mutações em *EGFR* varia em tumores de pacientes de diferentes localizações geográficas. Em tumores de pacientes da população Oriental, sua taxa de ocorrência é de 30 a 40% e em tumores de pacientes da população Ocidental entre 10 e 15% dos casos (48). As mutações mais comumente encontradas no domínio TK do *EGFR* são do tipo deleção nos éxons 19 e 21 (deleção *in-frame* em 45% dos casos, definida como delE746-A750 e mutação *missense* em 40% dos casos, definida como L858R) (49, 50). Importaneamente, a ocorrência dessas deleções prediz a sensibilidade aos inibidores TK do *EGFR* (49, 50).

Rearranjos afetando o gene *ALK* são encontrados em 2-5% dos pacientes com AdenoCa de pulmão, sendo mais comum em não fumantes ou fumantes leves, ex-tabagistas, homens e pacientes com diagnóstico de carcinoma pulmonar em idade mais jovem (51). Nesta população, a estimativa é que 30% desses pacientes terão rearranjo *ALK* nos seus tumores. Rearranjos envolvendo o gene *ALK* não são comuns em SCC e são mutuamente excludentes com as mutações do *K-RAS* e do *EGFR* (52).

Similarmente ao que ocorre com o rearranjo *ALK* em AdenoCa pulmonar, observa-se o rearranjo do proto-oncogene *ROS-1*, com uma frequência de 1,2 a 2,6% dos casos, sendo mais comum em pacientes jovens, sem história de tabagismo e de origem Asiática (53). Evidências clínicas sugerem que rearranjos no gene *ROS-1* conferem sensibilidade a inibidores TK, incluindo inibidores *ALK/MET*, tais como o Crizotinibe (54).

Apesar dos estudos supracitados, os quais identificaram genes importantes condutores da tumorigênese em NSCLC, aproximadamente 40% das alterações condutoras da tumorigênese em NSCLC ainda são desconhecidas. Portanto, estudos são necessários para a identificação e a elucidação do papel de outros genes ou RNAs reguladores da expressão gênica como condutores da tumorigênese pulmonar.

Dessa forma, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar novas alterações em NSCLC. Um estudo de sequenciamento de 518 genes (genes que codificam proteínas com atividade quinase) revelou 188 mutações em 120 genes nos carcinomas de pulmão. Estes genes incluíam receptores quinases (*ANKK1, DDR1, EPHA3, EPHA5, FGFR2, GPRK5, NTRK3, TRPM6*), genes que participam em mecanismos de reparo do DNA (*ATM, ATR, PRKDC*), que codificam proteínas envolvidas em mecanismos de sinalização celular (*BRAF, MAP2K4/JNKK1, STK11/LKB1*), proteínas associadas ao citoesqueleto (*NEK10, TTM*) e outros ainda não caracterizados. Outro estudo utilizou sequenciamento de 623 genes conhecidos ou associados ao câncer e identificou mais de 1.000 mutações em AdenoCa, sendo que 26 genes estavam frequentemente mutados (55); estes genes incluíam genes supressores tumorais (*TP53, STK11, NF1, ATM, APC, CDKN2A, RB1, INHBA*) e oncogenes (*KRAS, NRAS*) conhecidos, oncogenes com atividade tirosina-quinase (*EGFR, ERBB4, FGFR4, EPHA3, EPHA5, NTRK1, KDR, NTRK3, PDGFRA, LTK, PAK3*) e outros com papel ainda não determinado (*LRP1B, PTPRD, GNAS, ZMYND10/BLU, SLC38A3*).

Um estudo de grande impacto na literatura demonstrou a caracterização do perfil mutacional de SCC de pulmão realizado pelo projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)* (<http://cancergenome.nih.gov/>) que identificou 360 mutações em regiões exônicas, 323 segmentos com alterações no número de cópias do DNA e

165 rearranjos cromossômicos. Mutações no gene *TP53* foram observadas em 81% (144/178) amostras tumorais de SCC. Interessantemente, alterações relativamente raras em AdenoCa foram identificadas, tais como amplificações do gene *SOX2*, mutações em *NFE2L2* (fator nuclear eritróide 2, similar) e *KEAP1* (*kelch-like ECH-associated protein 1*, este gene é um alvo molecular no processo biológico de stress oxidativo), modificações na via de sinalização molecular do *PI3K* (fosfatidil inositol quinase), amplificação em *FGFR1* e mutações em *DDR2* (receptor de tirosina-quinase) (56, 57).

Embora tais estudos tenham levado à identificação de mutações em carcinomas pulmonares, ainda não há utilização clínica de muitas das mutações identificadas para o desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes, as quais possam beneficiar os pacientes com NSCLC (58).

*TCGA é um consórcio genômico internacional estabelecido para determinar as mutações, alterações genômicas, transcritômicas e epigenômicas mais frequentes em diferentes tipos de tumores humanos, incluindo carcinomas pulmonares de dois subtipos histológicos principais: adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas.

1.4. MicroRNAs (miRNAs)

O primeiro microRNA, lin-4, foi identificado em 1993 por Lee e cols. (59). O lin-4 foi associado ao tempo de desenvolvimento do nematóide *Caenorhabditis elegans*, pela modulação da proteína lin-14. Posteriormente, evidenciou-se que sequências de RNAs pequenos, não codificadores, de 19 a 22 nucleotídeos de comprimento, estavam expressas em diversos organismos, incluindo o *Homo sapiens*; tais sequências foram denominadas microRNAs (miRNAs), sendo altamente conservadas em diferentes espécies e apresentando expressão tecido específica (60-63).

Quanto à nomenclatura, os miRNAs são nomeados pela identificação da espécie seguida do número do miRNA, de acordo com a ordem de sua descoberta. Assim, por exemplo, para denominar o microRNA 21 em *Homo sapiens*, utiliza-se a nomenclatura hsa-miR-21.

Os miRNAs desempenham um papel regulatório importante em processos biológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a proliferação e diferenciação celulares e apoptose. Notavelmente, os miRNAs têm sido associados a diversas patologias incluindo mecanismos de oncogênese (60). Uma das primeiras evidências do envolvimento de miRNAs na tumorigênese humana foi demonstrado pela identificação de uma família de miRNAs (miR-15-16-1), localizada em 13q14, uma região de deleção característica de células tumorais de leucemia linfocítica crônica (da sigla em inglês CLL, *Chronic Lymphocytic Leukemia*). Esse achado associou essa deleção genômica com a perda da expressão do gene *BCL2* (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), o qual apresenta papel anti-apoptótico em células como os linfócitos (64). Tais estudos evidenciaram que os miRNAs estão frequentemente localizados em regiões de pontos de quebra e de perdas e ganhos genômicos associados a mecanismos patogênicos no câncer.

Os miRNAs regulam uma proporção substancial (~50%) dos genes expressos no genoma humano, sendo que um mesmo miRNA pode regular múltiplos genes (60). Os miRNAs são transcritos principalmente pela enzima RNA polimerase II, originando estruturas em grampo ou *hairpin* (miRNAs primitivos ou pri-microRNAs); os pri-miRNAs são processados no núcleo, pela RNase III Drosha, em estruturas precursoras ou pré-microRNAs, de ~70 a 100 nucleotídeos de comprimento. Os miRNAs precursores são exportados para o citoplasma, por um mecanismo mediado pela proteína de transporte Exportina 5, onde, em um passo seguinte, mediado pela RNase Dicer, gera a estrutura de RNA dupla fita (dsRNA), de aproximadamente 19-22 nucleotídeos, denominada 3p/5p ou miRNA. A molécula de miRNA é depois incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (da sigla em inglês RISC - *RNA-induced silencing complex*), enquanto que a outra cadeia é sujeita à degradação. Neste complexo, o miRNA maduro é capaz de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional. Na maioria das vezes, ocorre o pareamento parcial ou total da fita funcional do miRNA maduro com a porção 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (mRNA) alvo, resultando na inibição da tradução ou degradação do RNA mensageiro alvo (60).

Vários mecanismos podem levar a alterações na expressão de miRNAs, incluindo alterações genômicas como ampliações e deleções, mutações, polimorfismos, alterações epigenéticas e alterações na maquinaria de biogênese de miRNAs. Essas alterações são responsáveis pela desregulação dos níveis de expressão de miRNAs ou por alterações nos genes-alvo dos miRNAs em células tumorais (65).

Notavelmente, a descoberta dos miRNAs como importantes moduladores da expressão gênica e envolvidos em doenças crônico-degenerativas como o câncer tem sugerido que estas moléculas podem constituir biomarcadores clinicamente aplicáveis, com valor diagnóstico, prognóstico e preditivo, bem como apresentarem utilidade como moléculas terapêuticas no câncer (65).

Uma característica dos miRNAs, a qual torna essas moléculas atrativas para estudos moleculares, é a sua estabilidade; de fato, os miRNAs são moléculas mais estáveis quando comparados à molécula de RNA mensageiro (mRNA). Devido a essa característica, a sua expressão pode ser mais facilmente quantificada em amostras clinicamente relevantes, tais como tecidos obtidos de cirurgias ou biópsias, tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina para análise anatomo-patológica. Adicionalmente, os miRNAs podem ser detectados em fluidos corporais como o plasma e o soro e têm sido considerados como biomarcadores sensíveis e minimamente invasivos para a detecção de células tumorais circulantes (66).

Perfis de expressão global de miRNAs foram identificados como úteis para distinguir tecido normal de tumoral, como também para identificar o tecido primário de uma metástase, discriminar diferentes subtipos histológicos de tumores ou associados a anormalidades genéticas específicas. Um conjunto específico de miRNAs, por exemplo, foi identificado como diferencialmente expresso entre os subtipos de câncer de mama basal e luminal e foi utilizado para classificar, com alta especificidade, tumores positivos para os receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e/ou *HER2/neu* (65).

Em 2013, foram identificados 2.588 miRNAs no genoma humano (67). Um estudo de 2015 sugere que deve existir um número ainda maior (~6 mil) de miRNAs tecido-específicos no genoma humano (68).

Devido ao menor número de miRNAs comparado ao número de mRNAs (genes) expressos em nosso genoma, uma vantagem da análise de miRNAs em amostras clínicas é a utilização de um menor número de amostras para se alcançar um poder estatístico adequado, quando comparado à análise de expressão global do transcrito (mRNA). A análise de expressão de miRNAs, integrada à predição dos genes-alvo regulados por miRNAs, pode levar à elucidação de vias moleculares desreguladas no câncer.

1.5. MicroRNAs: aplicação terapêutica potencial

Os tumores sólidos humanos são doenças heterogêneas de alta complexidade quanto às alterações genéticas e epigenéticas associadas ao seu desenvolvimento e progressão. Portanto, drogas que modulam ou inibem um único alvo molecular, apesar de promissoras, geralmente não apresentam sucesso na resposta terapêutica (69, 70). Considerando que os miRNAs regulam a expressão de múltiplos genes-alvo e estão associados a mecanismos moleculares desregulados no câncer humano, tais moléculas podem constituir estratégias promissoras de tratamento do câncer (21). Desse modo, dependendo da função do miRNA no tecido e de sua expressão no tumor, há duas abordagens para o desenvolvimento de terapias baseadas em miRNAs: antagonistas ou mimetizadores de miRNAs (21). Moléculas antagonistas são aplicadas para inibir ou sequestrar miRNAs com expressão aumentada e moléculas miméticas são aplicadas para restaurar miRNAs com perda de função (71).

Existem estudos mostrando o potencial terapêutico dos miRNAs em doenças não neoplásicas. Uma descoberta recente indicou que o hsa-miR-122 está altamente expresso no fígado e é essencial para a estabilidade e propagação do RNA viral da Hepatite C (HCV). O uso de antagonistas do miRNA-122 em chimpanzés infectados cronicamente pelo HCV mostrou uma redução na carga viral nos animais (72). Posteriormente, em um estudo clínico de fase IIa, pacientes portadores de infecção crônica pelo HCV foram randomizados para receberem semanalmente, por cinco semanas, o inibidor específico anti-miRNA-122 ou placebo. O anti-miRNA-122 tem como objetivo sequestrar as moléculas de

miRNA-122, bloqueando sua ação no genótipo viral (HCV) e assim interferindo com a propagação do vírus. A análise de seguimento dos pacientes que receberam o anti-miR-122 mostrou redução da carga viral por 18 meses com bom perfil de segurança e baixa toxicidade (73). Em um estudo com ratos da linhagem C57BL/6, o uso do anti-miRNA levou ao silenciamento específico (~80%) do miRNA-122 no fígado, acompanhado pela regulação da expressão gênica e levando à redução dos níveis séricos de colesterol no plasma (74).

1.6. MicroRNAs em Câncer de Pulmão

Perfis diferenciais de expressão de miRNAs foram encontrados entre NSCLC dos subtipos AdenoCa e SCC e a expressão anormal de 5 miRNAs (miR-25, miR-191, miR-let7e, miR-34c-5p, miR-34a) foi correlacionada com uma baixa sobrevida de pacientes com SCC (75). A expressão do miR-205 foi capaz de classificar tumores do tipo AdenoCa vs. SCC (76). Uma correlação entre tabagismo e a alta expressão do miR-100 foi relatada em pacientes com AdenoCa pulmonar; esse mesmo estudo demonstrou que a expressão de miR125a-5p e let-7e estava significativamente diminuída em tumores comparado com amostras de tecido histologicamente normal de pacientes com AdenoCa. Adicionalmente, a expressão dos miRNAs, miR-93, miR-201 e miR-221 estava significativamente aumentada no tumor, quando comparado com o tecido pulmonar histologicamente normal de pacientes com SCC (77). Em outro estudo, perfis distintos de expressão de miRNAs foram utilizados como biomarcadores de recorrência em NSCLC de estadiamento I da doença (78). Estudos de expressão de miRNAs também têm identificado miRNAs como marcadores prognósticos em NSCLC. A expressão aumentada dos miRNAs miR-146b e miR-155 foi associada a uma menor sobrevida de pacientes com SCC pulmonar (79). Recentemente, a expressão diminuída do miR-99a foi associada ao aumento da expressão de mTOR/FGFR3 em carcinomas pulmonares; este estudo demonstrou que a restituição da expressão do miR-99a suprimiu a tumorigenicidade das células, sugerindo que a via molecular regulada pelo miR-99a seja importante no controle do crescimento celular tumoral (80). Interessantemente, a expressão do miRNA-

138 foi inversamente correlacionada com a expressão de *ERCC1* em linhagem celular de AdenoCa de pulmão resistente à cisplatina (81).

Adicionalmente, defeitos na maquinaria de biogênese dos miRNAs podem estar intimamente relacionados com a oncogênese. A deleção da enzima Dicer revoga a produção de miRNAs maduros. Em um modelo animal de carcinoma pulmonar contendo mutações em K-RAS, foi demonstrado que a deleção de Dicer 1 aumenta o crescimento celular do tumor (82). A expressão reduzida de Dicer foi associada a menor sobrevida em um estudo com 67 pacientes com NSCLC (82). Notavelmente, em carcinomas de ovário, mama e pulmão, a alta expressão de Dicer e Drosha foi associada à melhor sobrevida livre de doença (75).

Embora existam vários relatos de expressão de miRNAs em carcinomas pulmonares (75, 76, 78-80) não há dados na literatura de caracterização dos perfis globais de expressão de miRNAs e seus genes-alvo em NSCLC de pacientes brasileiros. Adicionalmente, a maioria dos estudos utilizaram a análise de um subgrupo seletivo de miRNAs e os dados ainda não têm sido aplicados, na prática, para melhorar o prognóstico ou para o desenvolvimento de novos tratamentos para pacientes com NSCLC.

Portanto, a análise global de perfis de expressão de miRNAs, bem como a integração dos dados de expressão de miRNAs com genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs, constituem análises necessárias para a identificação de vias moleculares desreguladas e que podem ter valor no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

1.7. MicroRNAs e alvos moleculares terapêuticos em câncer de pulmão

Mutações no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e alterações nos mecanismos de sinalização deste gene têm sido o foco principal de vários estudos de identificação de alterações genéticas em carcinomas pulmonares nos últimos 5 anos. Adicionalmente, mutações em *K-RAS*, um efetor *downstream* da via de sinalização do *EGFR*, são comuns em tumores de pacientes com câncer de pulmão e história de consumo excessivo de

tabaco, sendo encontradas em 20% a 30% dos NSCLC. Mutações em *EGFR* e *K-RAS* são mutualmente exclusivas e a presença de mutações em *K-RAS* está associada à resistência ao tratamento com inibidores do *EGFR*, porém parece não afetar os efeitos terapêuticos da quimioterapia convencional (83, 84).

O desenvolvimento de drogas inibidoras do domínio TK do *EGFR* levou a uma melhoria (embora não significativa) na sobrevida e qualidade de vida de pacientes com adenocarcinoma pulmonar (30, 49), sendo que a presença de mutações neste gene distingue pacientes responsivos e não-responsivos ao tratamento com essas drogas (28). Mutações em *EGFR* foram relatadas em 16/39 (41%) dos pacientes com NSCLC (85). Entretanto, estas terapias com alvos moleculares tem beneficiado uma fração muito pequena dos pacientes, sendo ainda necessária a identificação de novos biomarcadores com valor prognóstico e preditivo nessa doença (10).

Estudos recentes têm apontado uma associação entre o mecanismo de sinalização celular do *EGFR* e a expressão alterada de miRNAs. A perda de heterozigose no locus do gene que codifica o miR-128b foi correlacionada com resposta clínica e sobrevida de pacientes com NSCLC após o tratamento com Gefitinibe, um inibidor TKI do *EGFR* (86). Outro estudo demonstrou que a restituição da expressão do miR-145 inibia o crescimento celular de adenocarcinoma pulmonar em pacientes com mutações ativadoras no *EGFR*. O miR-7, que está com expressão diminuída em carcinomas pulmonares, também foi implicado como regulador negativo da via do *EGFR* (87). Finalmente, expressão aumentada do miR-21 foi correlacionada com ativação do mecanismo de sinalização do *EGFR*, especialmente na presença de mutações neste gene (88).

Ainda nesta linha, um número crescente de estudos indica a sensibilidade ou resistência ao tratamento sistêmico. Jiayu Li et al estudou 66 pacientes com NSCLC avançado e mostrou que pacientes com alta expressão do miR-200c, *EGFR* selvagem (sem mutações no domínio TK) e em uso de Gefitinibe tiveram maior sobrevida e maior taxa de resposta quando comparados com pacientes com baixa expressão do miR-200c; esses dados sugerem que o miR-200c pode ser um marcador preditivo de sensibilidade aos inibidores TK em pacientes com

NSCLC e EGFR selvagem (89). Finalmente, uma assinatura genética composta pelos miRNAs miR-1290, miR-196b e miR-135, em pacientes com adenocarcinoma de pulmão recidivado, mostrou uma maior predição de resposta a esquemas de quimioterapia a base de platina com alta acurácia (90).

2. Justificativa

Embora estudos anteriores tenham identificado miRNAs desregulados associados a carcinomas pulmonares, ainda faltam estudos de integração da expressão de miRNAs e genes-alvo regulados por miRNAs em NSCLC. Tais estudos são importantes para a identificação de vias moleculares mediadas por miRNAs e alteradas nesses tumores. A identificação de tais vias pode ser alcançada por meio de análises computacionais dos miRNAs e genes-alvo regulados por miRNAs. Avanços nas estratégias de tratamento devem ser alcançados a partir da identificação de novos biomarcadores prognósticos e/ou preditivos em NSCLC (91, 92).

3. Objetivos

Geral

Identificar o perfil global de expressão de miRNAs em pacientes com NSCLC dos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas.

Específicos

1. Determinar o perfil de expressão global de microRNAs em pacientes brasileiros com NSCLC dos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas;

2. Correlacionar as alterações na expressão de miRNAs com a sobrevida global dos pacientes com NSCLC, ajustados aos dados demográficos, fatores de risco, dados clínicos e histopatológicos;

3. Identificação de genes-alvo preditos a serem regulados pelos miRNAs alterados;

4. Integrar os dados de expressão de miRNAs com dados do TCGA, seus genes-alvo preditos e identificar vias moleculares potencialmente associadas ao desenvolvimento e progressão de NSCLC.

4. Material e Métodos

4.1. Considerações Éticas

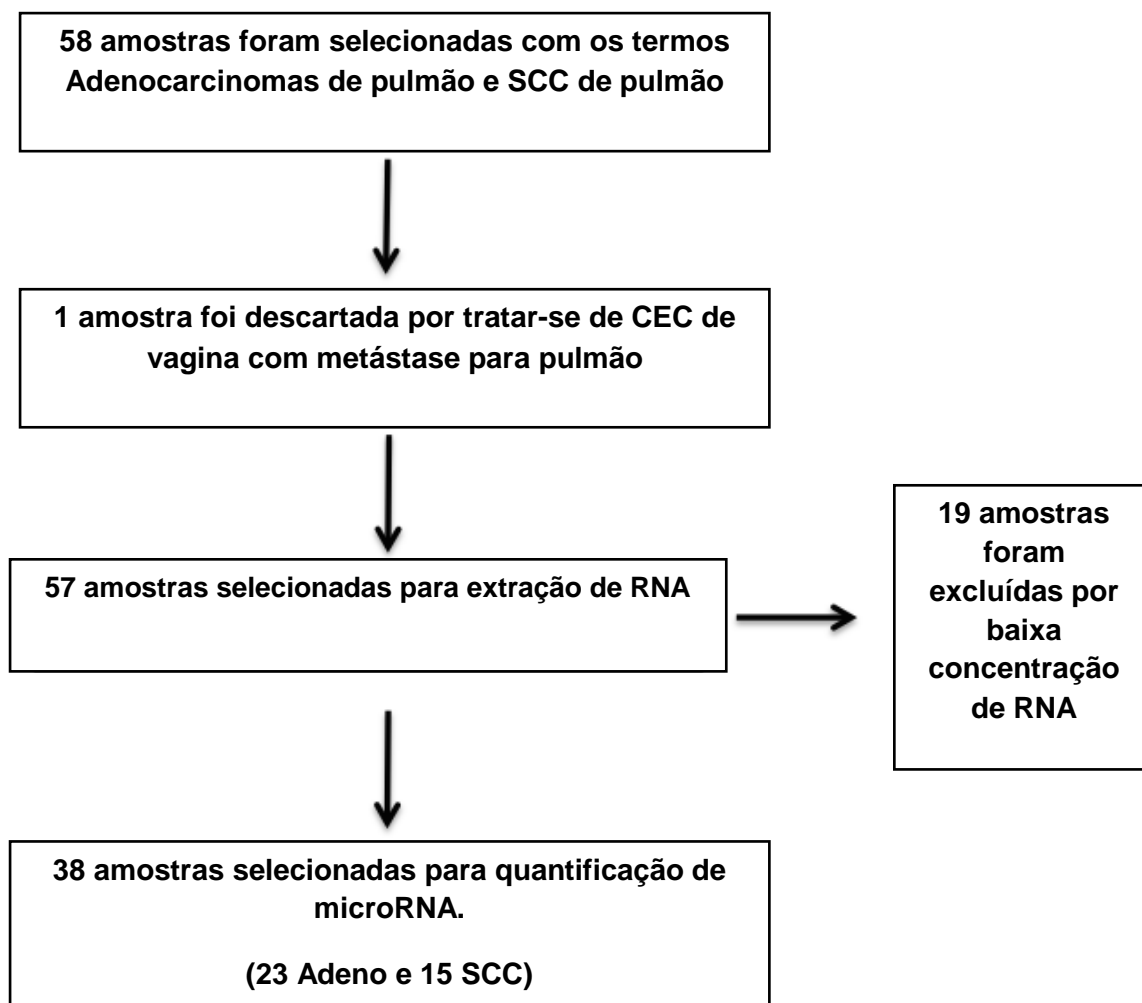
Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP (CEP #75907) e da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP (CEP #4319/2012).

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão dos pacientes foram: indivíduos maiores de 18 anos, diagnóstico de carcinoma pulmonar, de células não pequenas (subtipos histológicos: adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas), pacientes submetidos à biópsia para fins de diagnóstico, não tratados previamente com quimioterapia ou radioterapia, pacientes com tumores de qualquer localização anatômica nos pulmões e de qualquer estadiamento e grau histológico.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com diagnóstico de segundo tumor primário ou metástase pulmonar de um tumor primário de outra localização.

4.3. Delineamento experimental



4.4. Dados demográficos, fatores de risco e dados anatomo-patológicos

Foram analisados, individualmente, o prontuário de 38 pacientes que tiveram o diagnóstico de Carcinoma de Pulmão Não Pequenas Células, tratados no Hospital de Câncer de Barretos (28 pacientes) e na Faculdade de Medicina de Botucatu (10 pacientes), no período de 2007 a 2013, e suas amostras selecionadas para amplificação de microRNA e estudo do perfil de expressão de miRNAs. Foram coletados dados demográficos, tais como idade e sexo, dados referentes a fatores de risco, como história de tabagismo e etilismo e dados anatomopatológicos, como o grau histológico e estadiamento da doença. Além disso, foram coletadas informações sobre as estratégias terapêuticas utilizadas

em cada paciente, como por exemplo, o número de linhas de quimioterapia e a resposta ao tratamento.

O diagnóstico histopatológico foi baseado na classificação mais recente de carcinomas pulmonares, determinada pela Organização Mundial de Saúde .

4.5. Extração do RNA

O RNA das amostras de arquivo foi extraído utilizando o *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit* (Ambion/Life Technologies), o qual é otimizado para extração de RNA de amostras FFPE. Extraímos o RNA de 58 amostras de tumor e 9 amostras de tecido pulmonar histologicamente normal adjacente ao tumor. A qualidade e quantidade das amostras de RNA foram determinadas pela análise no NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). Das 57 amostras, 38 resultaram em RNA total de qualidade e quantidade suficientes para análise molecular.

4.6. Quantificação da expressão de miRNAs

A análise de expressão global de miRNAs foi realizada utilizando a plataforma *TaqMan® Array Human MicroRNA card A v3.0* (Life Technologies), um cartão de microfluidos contendo 384 microRNAs e otimizado para o uso com amostras de arquivo (FFPE). Essa plataforma contém 377 miRNAs humanos e miRNAs controles endógenos para normalização dos dados, bem como controles de amplificação. O protocolo utilizado seguiu as instruções do fabricante.

Os procedimentos foram realizados segundo as etapas: (1) Preparo do mix de transcrição reversa seguido da reação de transcrição reversa pelo Megaplex (contendo 4,5 µL do mix de RT e 3,0 µL de RNA); (2) Preparo da reação da PCR quantitativa em mix de reação contendo 450 µL do mix de amplificação, 6 µL de cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA e 444 µL de água livre de nuclease (Sigma ddH₂O); (3) Adição de 100 µL desse mix em cada poço do cartão – plataforma TLDA; (4) Centrifugação do cartão e (5) Análise de

quantificação da expressão dos miRNAs, utilizando o instrumento QuantStudio 12K (Life Technologies). O protocolo permite amplificar uma amostra por cartão. Foram determinados os perfis globais de expressão de miRNAs em um total de 41 amostras (38 tumores e 3 *pools* de amostras de tecido pulmonar normal). Cada *pool* foi preparado de modo a conter 3 amostras de RNA extraído de tecido normal. Portanto, 3 *pools* representam um total de 9 amostras de RNA de tecidos pulmonares histologicamente normais.

Os perfis de expressão de miRNAs em tumores foram calculados relativo aos perfis de expressão de miRNAs em amostras de tecido pulmonar normal. Considerando que a expressão de miRNAs é tecido-específica, a utilização das amostras de tecido pulmonar normal é importante para confirmar quais miRNAs estão diferencialmente expressos no pulmão. O método de análise empregado foi o DeltaDelta Ct (93). O programa de análise dos dados de expressão de miRNAs foi o RQ Manager v1.2 (Life Technologies); o qual faz parte do equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies).

4.7. Análise estatística dos dados

Foram utilizadas diferentes metodologias de análise estatística para estudar a possível relação entre a expressão dos miRNAs alterados com os dados clínicos e prognóstico dos pacientes com Adenocarcinoma e SCC. Utilizamos o teste Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher (94). Para detectar diferenças estatisticamente significativas, considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas dos dados foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics v.21 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

A sobrevida global foi avaliada por meio da associação dos resultados de miRNAs desregulados nos tumores (NSCLC) com os dados demográficos, fatores de risco, clínicos, histopatológicos, tratamento e sobrevida dos pacientes. Os valores de expressão dos miRNAs foram categorizados em *up* e *down* utilizando o valor da mediana de todos os pacientes avaliados como valor de corte. Os dados

coletados dos prontuários médicos foram tabulados, com intuito de obter o cálculo da média, desvio padrão, mínimo, máximo e quartis para variáveis quantitativas e tabelas de frequências para variáveis qualitativas.

A sobrevida global foi estimada pelo método não-paramétrico de Kaplan Meier. A análise comparou a sobrevida a cada característica, clínica e sócio-demográfica, pelo Teste de Log-Rank. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$. O programa utilizado foi o *Survival* no ambiente R v.3.2.1.

4.8. Análise bioinformática dos dados

Inicialmente foi realizada a análise dos componentes principais (PCA) a partir dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ dos miRNAs significativos de cada paciente utilizando os pacotes *ade4* e *EMA* no ambiente R. Trata-se de uma análise multivariada de redução dimensional dos dados que permite a avaliação do agrupamento dos grupos experimentais baseado na expressão dos miRNAs selecionados.

Adicionalmente, foi realizada a análise computacional de predição de alvos dos miRNAs diferencialmente expressos utilizando o programa de bioinformática *mirDIP* (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>). A Interação entre os alvos e a construção das redes de interação proteína-proteína (PPI) foi realizada utilizando-se as ferramentas *Interologous Interaction Database* (IID) (<http://ophid.utoronto.ca/i2d>) (95). A construção das redes e as análises de enriquecimento funcional foram realizadas utilizando o programa *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org>). Foram utilizadas categorias as funcionais função molecular (MF), processos biológicos (BP) e *GoSlim* do Gene Ontology por meio do plugin *BiNGO*. O enriquecimento por vias foi realizado utilizando o plugin *Reactome FI*. Esse plugin também faz um enriquecimento por doença utilizando a lista do NCI diseases, que contém mais de 2000 categorias. Em todas as análises de enriquecimento funcional foi considerado $p \leq 0.05$.

Finalmente, foi feita uma validação *in silico* dos miRNAs diferencialmente expressos e de alvos selecionados (mRNA) utilizando dados de expressão global

de microRNAs (miRNA-Seq) e RNA mensageiro (RNA-Seq), disponíveis publicamente no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov>). A ferramenta TCGA-Assembler (<http://www.compgenome.org/TCGA-Assembler/>) foi utilizada para o download e processamento dos dados. Foram analisados os dados de sequenciamento de alto desempenho dos tumores pulmonares do tipo AdenoCa e SCC. Para as amostras de AdenoCa, incluímos dados de miRNA-Seq de 561 tumores e dados de RNA-Seq de 576 tumores. Para as amostras de SCC, incluímos dados de miRNA-Seq de 552 amostras e dados de RNA-Seq de 523 amostras. Foram obtidos os valores de expressão em reads por milhão mapeadas (RPM) em escala log₂. Foi utilizado teste T para comparar os valores de expressão entre AdenoCa e SCC, considerando o nível de significância de $p \leq 0.05$. A construção dos gráficos foi realizada utilizando-se o pacote beeswarm no ambiente R.

5. Resultados

Os resultados estão apresentados a seguir, de acordo com cada objetivo do projeto.

5.1. Objetivo 1: Determinar o perfil de expressão global de microRNAs em NSCLC dos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas

5.1.1. Análise dos controles endógenos:

Os dados de expressão de miRNAs foram normalizados utilizando controles endógenos, os quais constituem controles internos que não devem variar significativamente em níveis de expressão nas amostras teste e controle normal. Os controles endógenos frequentemente utilizados em análises de expressão de miRNAs são o RNU-44, RNU-48 e U6 (RNA nucleolar pequeno); estes se encontram incluídos na plataforma TLDA. Adicionalmente, a análise dos controles endógenos indica a qualidade das reações de amplificação. Assim, esta análise é fundamental e um dos primeiros passos a serem realizados em estudos de expressão de miRNAs. Os resultados de expressão dos controles endógenos RNU-44, RNU-48 e U6 estão apresentados na Figura Suplementar 1 (Apêndice 1). Os dados mostram um padrão consistente e estável de expressão desses miRNAs endógenos, o que comprova a sua utilidade como controles da reação.

Adicionalmente, a Figura Suplementar 2 (Apêndice 1) mostra as curvas de amplificação dos miRNAs controles endógenos (painel A, RNU-44; painel B, RNU-48 e painel C, U6). As curvas de amplificação obtidas mostram que todas as amostras de tumores e tecido normal possuem sinal de amplificação específica de miRNAs.

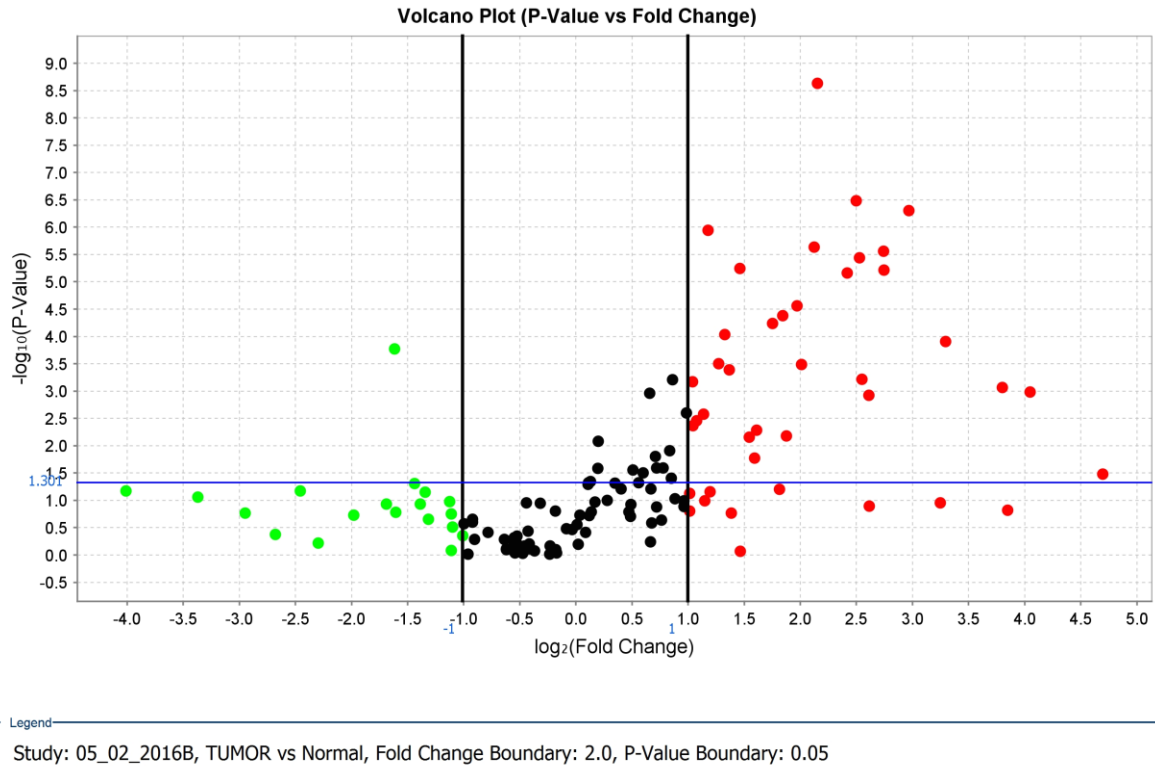
5.1.2. Amostras controle

As amostras controle (tecidos pulmonares histologicamente normais) também foram analisadas quanto aos perfis de expressão de miRNAs e se estes estavam correlacionados nos diferentes *pools*. A análise revelou alta correlação entre os perfis de miRNAs em todos os *pools*, mostrando portanto variação não significativa e que esses são controles de alta reprodutibilidade. A Figura Suplementar 3 (Apêndice 1) mostra correlação entre os perfis de expressão de miRNAs nos três diferentes *pools*. Cada pool é composto por três amostras normais diferentes. Portanto, os três pools representam um total de nove amostras de tecido pulmonar normal.

5.1.3. Expressão desregulada de miRNAs em NSCLC

Os níveis de expressão dos 377 miRNAs analisados foram calculados nas amostras de tumores, normalizados utilizando os miRNAs endógenos RNU-44, RNU-48 e U6 e comparados com os pools de amostras normais. A Figura 1 mostra os dados plotados de acordo com o nível de alteração observada na expressão de cada miRNA (*fold change* $\geq 2,0$ e $p < 0,05$). Selecionamos os dados com um nível de significância de $p < 0,05$, para assegurar que um maior número de miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa fosse selecionado nas análises posteriores (bioinformática e estatística) (Objetivos 2, 3 e 4).

Figura 1. Dados de expressão de miRNAs mostrando miRNAs com expressão aumentada (vermelho) e diminuída (verde) relativa às amostras controle (tecidos pulmonares histologicamente normais) e normalizados de acordo com os controles endógenos.



Os 33 miRNAs encontrados com perfis de expressão significativamente desregulados ($fold\ change \geq 2,0$ e $p < 0,05$) estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. miRNAs significativamente desregulados em CPNPC comparado ao tecido normal. RQ é o valor da expressão do miRNA relativa aos pools de amostras de pulmão normal.

miRNA	RQ	Valor de <i>P</i>
hsa-miR-143-3p	0.326	<0,01
hsa-miR-140-5p	0.369	0.049
hsa-miR-376c-3p	2.057	0.001
hsa-miR-141-3p	2.060	0.004
hsa-miR-20a-5p	2.107	0.003
hsa-miR-199a-3p	2.199	0.003
hsa-miR-374-5p	2.260	<0,01
hsa-miR-130a-3p	2.414	<0,01
hsa-miR-29b-3p	2.511	<0,01
hsa-let-7d-5p	2.580	<0,01
hsa-miR-93-5p	2.751	<0,01
hsa-miR-142-3p	2.920	0.007
hsa-miR-15a-5p	3.016	0.017
hsa-miR-155-5p	3.056	0.005
hsa-miR-25-3p	3.371	<0,01
hsa-miR-429	3.593	<0,01
hsa-miR-452-5p	3.668	0.007
hsa-miR-20b-5p	3.917	<0,01
hsa-miR-135b-5p	4.026	<0,01
hsa-miR-708-5p	4.354	<0,01
hsa-miR-200b-3p	4.446	<0,01
hsa-miR-340-5p	5.345	<0,01
hsa-miR-744-5p	5.649	<0,01
hsa-miR-365-3p	5.766	<0,01
hsa-miR-205-5p	5.856	0.001
hsa-miR-590-5p	6.112	0.001
hsa-miR-224-5p	6.692	<0,01
hsa-miR-15b-5p	6.712	<0,01
hsa-miR-21-5p	7.827	<0,01
hsa-miR-95-3p	9.817	<0,01
hsa-miR-31-5p	13.929	0.001
hsa-miR-196b-5p	16.525	0.001
hsa-miR-411-5p	25.909	0.033

5.2. Objetivo 2: Correlacionar as alterações na expressão de miRNAs com a sobrevida global dos pacientes com NSCLC, ajustados aos dados demográficos, fatores de risco, dados clínicos e histopatológicos.

5.2.1. Dados demográficos, fatores de risco e dados anatomopatológicos

Das 38 amostras, 23 eram de pacientes com o diagnóstico de AdenoCa e 15 eram de pacientes com o diagnóstico de SCC. Baseada na nova classificação patológica dos subtipos de AdenoCa, tivemos em nossa amostra 9 casos de adenoCa acinar, 5 casos de AdenoCa sólido, 1 caso de AdenoCa papilar, 4 casos de AdenoCa lepidico com componenete acinar e 4 casos que não foi possível avaliação do subtipo. Pacientes com AdenoCa tinham uma idade média de 60,9 anos, sendo 13 homens e 10 mulheres e aproximadamente 70% tinham história de tabagismo ativo ou eram ex-tabagistas. Pacientes com SCC tinham uma idade média de 62 anos, eram 11 homens e 4 mulheres e 93,3% tinham história de tabagismo ativo ou eram ex-tabagistas. Entre as mulheres foi mais comum a histologia do tipo AdenoCa, porém sem diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

A cirurgia foi a principal modalidade de tratamento para 37 de 38 pacientes, dos quais 34 realizaram lobectomia com linfadenectomia (21 Adenoca e 13 SCC) e 3 realizaram pneumectomia com linfadenectomia (2 Adenoca e 1 SCC). Um paciente era estadio IV ao diagnóstico e não foi candidato para cirurgia. Um dos pacientes foi à óbito devido à complicações após a cirurgia.

Em relação às estratégias de tratamento, a quimioterapia adjuvante não foi indicada para 25 pacientes, devido ao estadiamento da doença classificado como IA e IB e sem a presença de fatores de risco. Dois pacientes evoluíram com recidiva tumoral e um foi à óbito pela doença antes do tratamento quimioterápico paliativo.

Um terço destes pacientes receberam quimioterapia adjuvante (13 no total, sendo 8 Adenocarcinoma e 5 SCC) devido à doença loco-regional avançada (estadiamento Ib, II ou III) com objetivo de aumentar a sobrevida livre de doença e

a sobrevida global. As estratégias de tratamento prescritas foram combinações de: (1) Paclitaxel + Carboplatina, (2) Vinorelbine + Cisplatina e (3) Gencitabina + Cisplatina. Destes 13 pacientes, 4 evoluíram com recidiva à distância e necessitaram de quimioterapia paliativa de segunda linha e 2 foram à óbito devido à recidiva tumoral.

No total, foram identificados 8 óbitos devido à doença (4 Adenoca e 4 SCC) e 8 óbitos por outras causas (3 Adenoca e 5 SCC). Ao final do seguimento, 15 pacientes estavam vivos sem doença (10 Adenoca e 5 SCC) e 7 pacientes estavam vivos com doença (6 Adenoca e 1 SCC).

Esses dados estão resumidos na Tabela 2.

A Tabela 3 apresenta a análise univariada dos dados de acordo com os subtipos histológicos.

Tabela 2: Dados demográficos, fatores de risco e características clínico-patológicas. Nesta tabela, os adenocarcinomas não foram subdivididos nos subtipos histológicos, devido ao número limitado de pacientes.

Características	AdenoCa	SCC
Idade		
Média	60,91	62
Varição	40 – 84	51 – 73
Sexo – no.(%)		
Masculino	13 (47,8)	11 (73,4)
Feminino	10 (52,2)	4 (26,6)
Tabagismo – no.(%)		
Não	7 (30,5)	1 (6,7)
Sim	16 (69,5)	14 (93,3)
Estadiamento – no.(%)		
I	9 (39,1)	4 (26,7)
II	6 (26,1)	4 (26,7)
III	8 (34,8)	6 (40)
IV	0	1 (6,6)
No. de terapias prévias		
0	16	10
1	5	2
2	1	2
3	1	0
4	0	1
Óbitos – no.		
Câncer-específico	4	4
Global	7	9

Tabela 3. Análise univariada de acordo com os subtipos histológicos.

Variáveis	Característica	AdenoCa		SCC		Valor de <i>P</i>
		N	%	N	%	
Sexo	Feminino	10	43,5%	04	26,7%	0,29
	Masculino	13	56,5%	11	73,3%	
Tabagismo	Não	07	30,4%	01	6,7%	0,11**
	Sim	16	69,6%	14	93,3%	
Etilismo	Não	12	57,1%	10	71,4%	0,39
	Sim	09	42,9%	04	28,6%	
Idade (anos)	Média (SD)	Média (SD)				0,73***
	61 (10)	62 (7)				

* Teste Qui quadrado, ** Teste Exato de Fisher, Teste T para variáveis independentes.

A análise estatística de correlação dos dados de expressão de miRNAs e os dados demográficos, fatores de risco, dados clínicos e anatomo-patológicos mostrou associações significativas. Uma das correlações encontradas foi com o subtipo histológico, sendo que os miRNAs miR-376, miR-20a, miR-93-5p, miR-20b, miR-708, miR-205, miR-374-5p e o miR-196b estavam com expressão diferencial significativa entre Adeno e SCC ($p < 0,05$). Os miRNAs miR-376, miR-20a, miR-93-5p, miR-20b, miR-708, miR-205 e o miR-196b estavam com expressão aumentada (definido como *over*) mais frequente em SCC, e com expressão diminuída (definido como *under*) eram mais frequentes em AdenoCa. Já o miR-374-5p estava com expressão aumentada com maior frequência em AdenoCa quando comparado com SCC. Esses dados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Correlações estatisticamente significativas entre os dados de expressão de miRNAs e o tipo histológico.

		Tipo histológico				<i>P</i> *
		Adeno		SCC		
		N	%	N	%	
miR-376	<i>under</i>	14	66,7%	3	23,1%	0,013
	<i>over</i>	7	33,3%	10	76,9%	
miR-20a	<i>under</i>	15	65,2%	4	26,7%	0,02
	<i>over</i>	8	34,8%	11	73,3%	
miR-93-5p	<i>under</i>	15	65,2%	4	26,7%	0,02
	<i>over</i>	8	34,8%	11	73,3%	
miR-20b	<i>under</i>	12	66,7%	3	23,1%	0,017
	<i>over</i>	6	33,3%	10	76,9%	
miR-708	<i>under</i>	16	69,6%	2	14,3%	0,001
	<i>over</i>	7	30,4%	12	85,7%	
miR-205	<i>under</i>	13	81,3%	2	14,3%	< 0,001
	<i>over</i>	3	18,8%	12	85,7%	
miR-374-5p	<i>under</i>	7	30,4%	11	78,6%	0,004
	<i>over</i>	16	69,6%	3	21,4%	
miR-196b	<i>under</i>	14	82,4%	2	13,3%	< 0,001
	<i>over</i>	3	17,6%	13	86,7%	

Under: expressão diminuída; Over: expressão aumentada.

* Valores de *P* determinados de acordo com o Teste do Qui quadrado

Outra correlação encontrada foi com o tabagismo (Tabela 5), sendo que os miRNAs miR-20a e miR-93 que estavam com expressão aumentada eram mais frequentes entre os pacientes com história de tabagismo ($p < 0,05$).

Tabela 5. Análise Univariada para tabagismo

		Tabagismo				p
		Não		Sim		
		N	%	N	%	
Sexo	Feminino	4	50,0%	10	33,3%	0,43*
	Masculino	4	50,0%	20	66,7%	
Etilismo	Não	7	87,5%	15	55,6%	0,21*
	Sim	1	12,5%	12	44,4%	
miR-20a	down	7	87,5%	12	40,0%	0,042*
	up	1	12,5%	18	60,0%	
miR-93	down	7	87,5%	12	40,0%	0,042*
	up	1	12,5%	18	60,0%	
		Media (Desvio Padrão)		Media (Desvio Padrão)		0,73**
Idade (anos)		63 (15)		61 (7)		

?

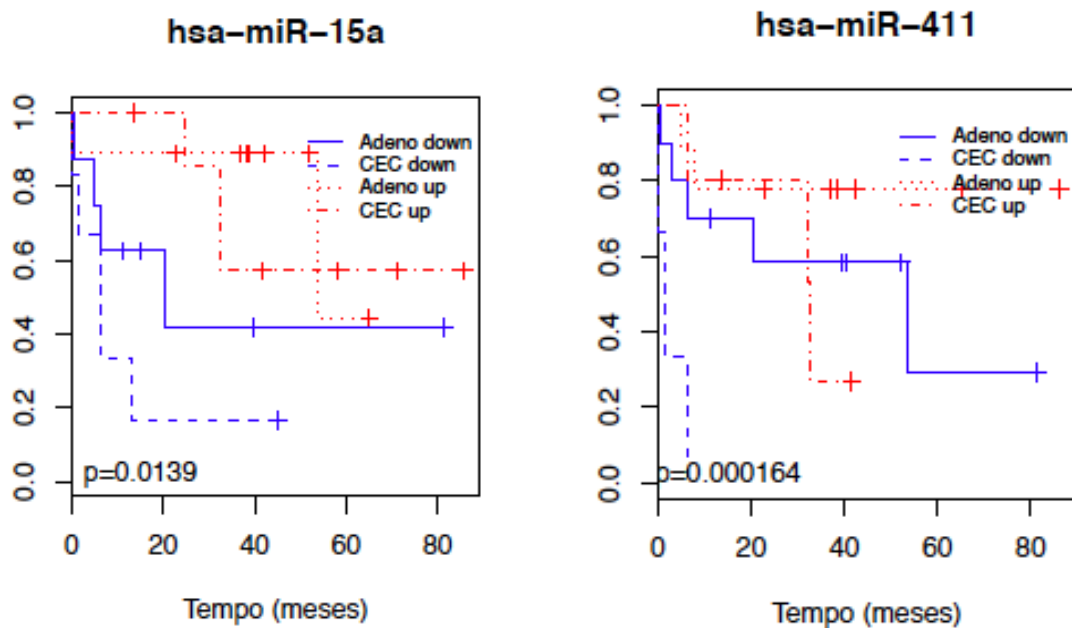
* Teste Exato de Fisher, ** Teste T para variáveis independentes

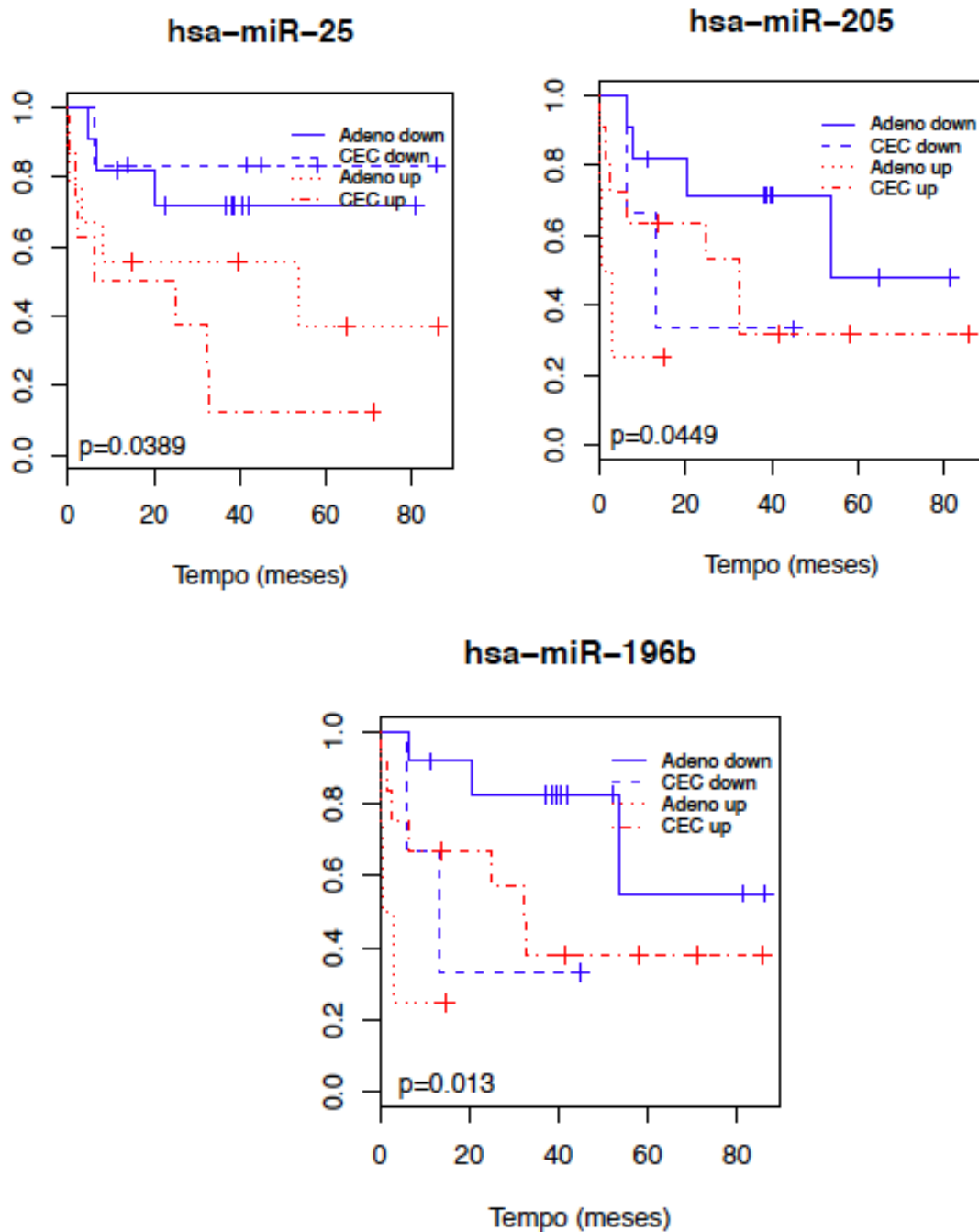
5.2.2. Kaplan Meier

A análise de Kaplan-Meier foi realizada considerando cada miRNA com expressão aumentada ou diminuída, conforme determinado pelo estudo da mediana. O cálculo da sobrevida global foi baseado no tempo em meses desde o diagnóstico até o óbito pela doença, óbito por outras causas ou último seguimento do paciente. O teste de log-rank foi utilizado para o cálculo estatístico. Utilizamos o pacote survival (<https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html>) no ambiente estatístico R (<https://www.r-project.org>) versão 3.2.1.

A análise de sobrevida global mostrou que a expressão diminuída dos miR-15a e miR-411 e a expressão aumentada dos miR-25, miR-205 e miR-196b estavam significativamente associadas ($p < 0,05$) com pior sobrevida dos pacientes, independente do subtipo histológico (adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas) (Figura 2). A Figura Suplementar 4 (Apêndice 2) mostra as curvas de sobrevida independente do subtipo histológico e a Figura Suplementar 5 (Apêndice 3) mostra as curvas de sobrevida detalhando os casos de AdenoCa e SCC.

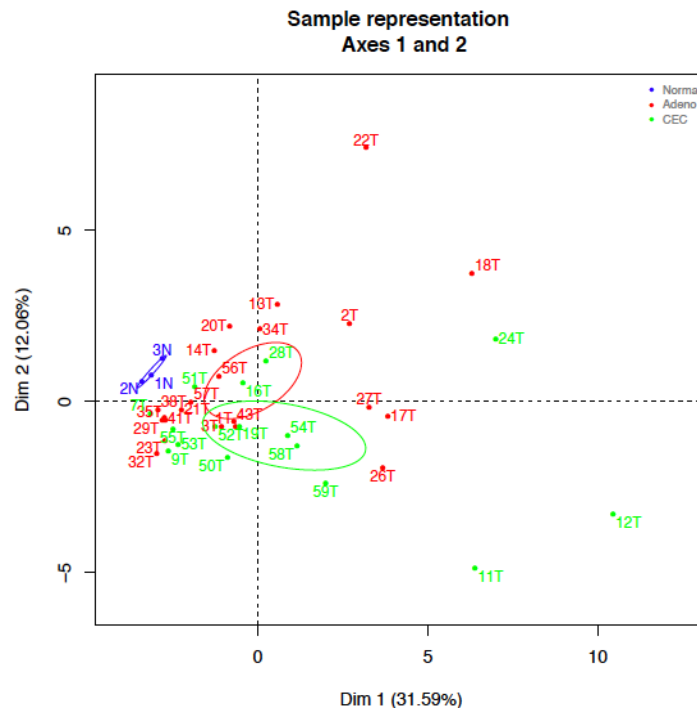
Figura 2. Curvas de Kaplan-Meier mostrando associação dos miRNAs desregulados com a sobrevida global dos pacientes com AdenoCa e SCC.





Adicionalmente, realizamos uma análise dos componentes principais (PCA) a partir dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ dos miRNAs significativos de cada paciente. A Figura 3 mostra uma análise multivariada dos grupos experimentais de acordo com a expressão dos miRNAs selecionados.

Figura 3. Análise multivariada dos grupos experimentais de acordo com a expressão de miRNAs.



5.3. Objetivo 3: Identificação de genes-alvo preditos a serem regulados pelos miRNAs alterados;

Os dados da análise de predição mostraram vários genes (ou mRNAs) potencialmente regulados pelos miRNAs identificados, os quais codificam proteínas com funções biológicas importantes na tumorigênese, tais como o controle da transcrição, tradução, morte celular programada ou apoptose, entre outras.

A relevância biológica dos alvos dos miRNAs foi analisada usando dados de bioinformática. Encontramos que o miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708 e o miR-744 estavam relacionados com vias biologicamente relevantes na tumorigênese.

Os mRNAs-alvo regulados por miRNAs desregulados em NSCLC (*EGFR*, *NRAS*, *BRAF*, *PI3K*, *HER2* e *RB1*) estão envolvidos em vias de sinalização no

câncer. Adicionalmente, *EGFR*, *TP53*, *HER2*, *KRAS*, *BRAF* e *RB1* estão diretamente relacionados com tumores de classificação histológica NSCLC. Quando avaliamos os genes-alvo dos miRNAs desregulados identificamos que os genes *TP53*, *HER2*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS* e *PTEN* estavam alterados em câncer de uma maneira geral. Interessantemente, nossos dados indicam que os genes-alvo preditos a serem regulados pelos miRNAs alterados estão frequentemente desregulados em câncer, principalmente em NSCLC.

A Tabela 6 lista os mRNAs-alvo preditos dos miRNAs alterados e as respectivas vias moleculares associadas a esses genes conhecidos e desconhecidos.

Tabela 6. Alvos potencialmente regulados pelos miRNAs identificados.

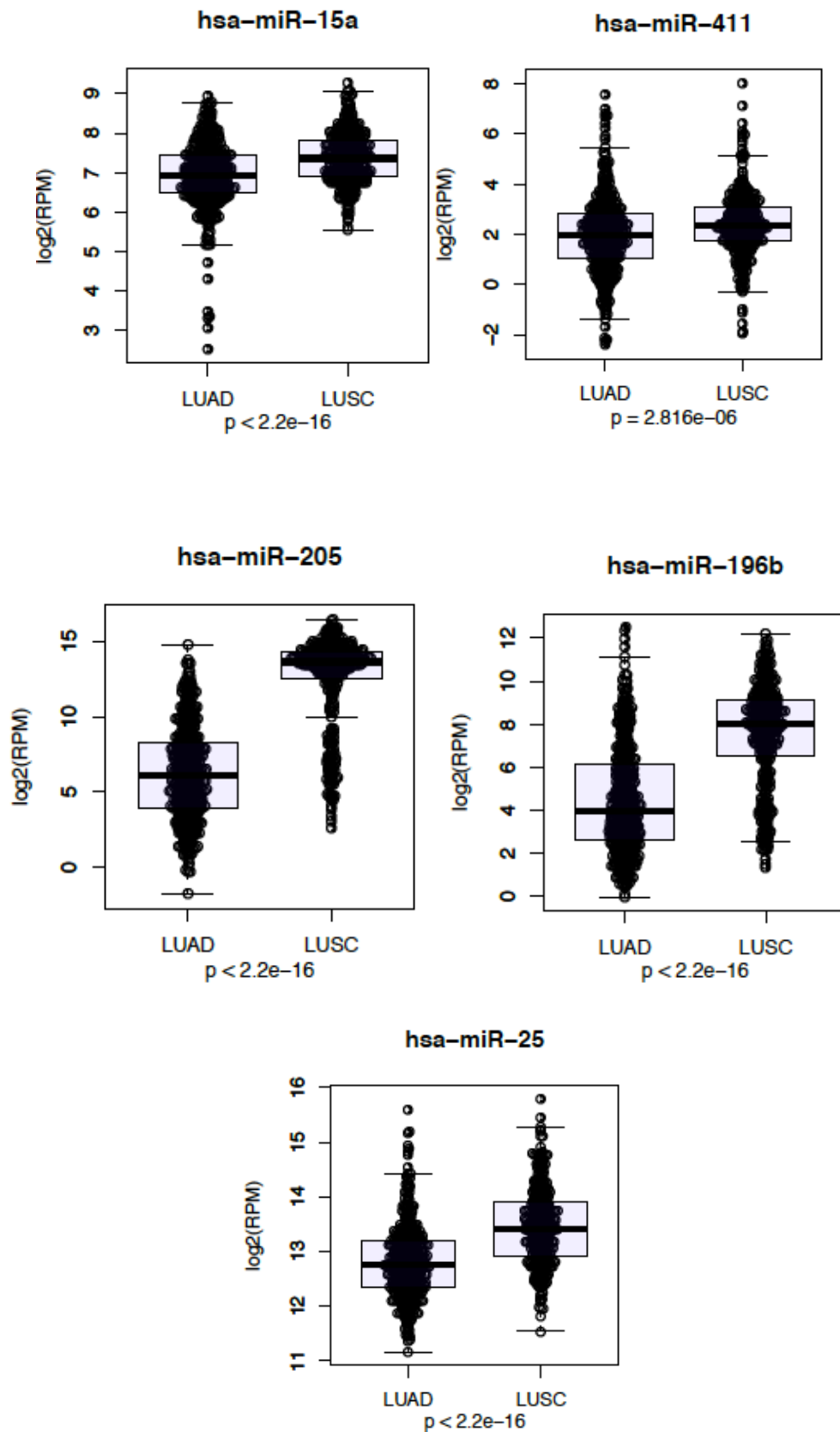
Vias moleculares	Valor de P (FDR)	MicroRNA	Genes alvos conhecidos	Genes alvos desconhecidos
Câncer	<6.250e-05	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	EGFR NRAS BRAF PI3K HER2 RB1	JUP, JUN, NFKBIA, ARHGEF12, ARHGEF11, IGF1, GSK3B, GNA13, GNA12, TGFB1, TGFB2, HIF1A, EP300, PTK2, CDKN1A, CDKN1B, HDAC2, HDAC1, E2F1, CBL, BAD, CTBP1, CXCL8, KIT, PDGFB, FOXO1, FGFR2, FGFR1, RBX1, FN1, FOS, RALBP1, MDM2, APC, RALGDS, CTNNB1, GNG5, CTNNA1, GNAI3, GNAI1, DVL2, DVL3, MAP2K1, TGFBR1, DVL1, CCNE1, ARHGEF1, CCND1, GNB2, GNAQ, GNB1, GNB4, PML, TRAF1, TRAF2, TRAF6, TRAF3, RHOA, CDK6, CDK4, CDK2, DCC, CDH1, ADCY6, PDGFRB, SMAD4, SMAD3, SMAD2, NFKB1, NFKB2, FGF19, FGF18, ARNT2, FGF10, AXIN2, AXIN1, HSP90AB1, AKT1, AKT2, HSP90AA1, CRKL, CRK, CUL2, RAC2, RAC3, RAC1, FH, FGF5, FGF7, FGF9, FGF2, FGF3, FGF4, AR, TP53, APPL1, RALB, RALA, RELA, EGF, IKBKG, ABL1, IKBKB, CASP3, RAF1, LPAR2, GLI2, GLI3, GLI1, BIRC3, PRKACA, PRKACB, GRB2, CHUK, PRKCA, LEF1, ROCK1, ROCK2, SKP2, SOS1, SOS2, RASSF5, RASSF1, CDC42, IGF1R, CREBBP, SUFU, STAT1, FZD7, STAT3, STK4, PLCG1, PLCB4, TCF7L2, RASGRP3.
NSCLC	<1.235e-05	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	EGFR TP53 HER2 RB1 KRAS BRAF	E2F1, BAD, PDPK1, FOXO3, MAP2K1, CCND1, CDK6, CDK4, AKT1, AKT2, PIK3CG, MAPK1, EGF, RAF1, GRB2, SOS1, SOS2, RASSF5, RASSF1, STK4, PLCG1.
SCLC	2.79e-04	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	PTEN TP53 PI3K RB1	NFKBIA, PTK2, CDKN1B, E2F1, FN1, CCNE1, CCND1, TRAF1, TRAF2, TRAF6, TRAF3, CDK6, CDK4, CDK2, NFKB1, AKT1, AKT2, PIK3CG, RELA, IKBKG, IKBKB, BIRC3, CHUK, SKP2.
miRNAs em Câncer	8.55e-04	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	TP53 HER2 EGFR KRAS NRAS PTEN	ATM, EZH2, TGFB2, EP300, BMPR2, HDAC4, CDKN1A, CDKN1B, HDAC1, E2F1, CD44, PDGFB, BRCA1, PDCD4, SHC1, MDM2, MDM4, APC, BCL2L11, MAP2K1, CCNE1, CCND1, DDIT4, RHOA, CDK6, HMGA2, PDGFRB, NFKB1, BMI1, PAK4, CRKL, CRK, MAPK1, TP63, STMN1, ABL1, IKBKB, KIF23, CASP3, RAF1, GRB2, MTOR, PRKCA, UBE2I, PRKCE, PIK3R2, SIRT1, ROCK1, SOS1, SOS2, RASSF1, IRS1, HNRNPK, VIM, CDC25C, CDC25A, CDC25B, CREBBP, NOTCH1, THBS1, STAT3, MCL1, PLCG1.

5.4. Objetivo 4: Integrar os dados de expressão de miRNAs com dados da literatura (TCGA), seus genes-alvo preditos e identificar vias moleculares potencialmente associadas ao desenvolvimento e progressão de NSCLC.

Nesse estudo, obtivemos o perfil de expressão de miRNAs de 561 amostras de tumor de AdenoCa e 552 amostras de tumor de SCC a partir do banco de dados TCGA e identificamos os miRNAs com alteração significativa entre tecido tumoral e normal. A relação entre sobrevida global e a identificação de uma assinatura de miRNAs foi integrada com os dados do TCGA. Nos dados do TCGA, os miRNAs mir-15a, miR-196b, miR-25, miR-205 e miR-411 estão diferencialmente expressos em AdenoCa e SCC, concordante com os nossos dados. A validação dos miRNAs identificados em nosso estudo sugere que esses miRNAs podem constituir biomarcadores prognósticos em NSCLC.

Os perfis de expressão de miRNAs (conforme análise dos dados do banco TCGA) estão apresentados na Figura 4. A Figura Suplementar 6 (Apêndice 4) mostra os dados para todos os miRNAs identificados no banco de dados TCGA.

Figura 4. Expressão desregulada dos miRNAs miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b e miR-411 (dados do TCGA).



6. Discussão

A identificação de miRNAs como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica tem contribuído para o entendimento da biologia tumoral, incluindo o câncer de pulmão (96). Alterações na expressão de miRNAs levam à desregulação da expressão de genes-alvo, sendo que as vias moleculares alteradas podem ter papéis importantes no desenvolvimento e progressão tumoral. Estudos têm mostrado miRNAs desregulados em carcinomas pulmonares (97, 98).

Neste estudo, avaliamos o perfil de expressão global de miRNAs em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC) e identificamos 33 miRNAs (miR-143, miR-140-5p, miR-376c, miR-141, miR-20a, miR-199a-3p, miR-374-5p, miR-130a, miR-29b, let-7d, miR-93-5p, miR-142-3p, miR-15a, miR-155, miR-25, miR-429, miR-452, miR-20b, miR-135b, miR-708, miR-200b, miR-340, miR-744, miR-365, miR-205, miR-590-5p, miR-224, miR-15b, miR-21, miR-95, miR-31, miR-196b e o miR-411) com expressão significativamente desregulada nos tumores comparado com os tecidos pulmonares normais. Quando comparamos os pacientes com diagnóstico de AdenoCa com aqueles com SCC, identificamos que a expressão diminuída do miR-15a e do miR-411 e a expressão aumentada do miR-25, do miR-205 e do miR-196b estavam correlacionadas significativamente com pior sobrevida global ($p < 0.05$). Entretanto, as associações observadas foram independente do subtipo histológico.

O miR-15a age como supressor de tumor ao inibir o oncogene *BCL2*, o qual atua em mecanismos de sobrevivência da célula (99) e na resposta a agentes quimioterápicos (100, 101). Estudos mostraram uma correlação entre a baixa expressão do miR-15a no tumor vs. tecido normal de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico do câncer de pulmão, sendo mais evidente em pacientes com doenças em estadiamentos I e II (102) e confirmaram o papel pró-apoptótico do miR-15a por meio da ativação das Caspases 3/7, redução da viabilidade celular e inibição do *BCL2*. Portanto, o miR-15a pode constituir um alvo de terapia moduladora da apoptose em NSCLC com alta expressão do *BCL2* (103). Porém, até o momento, nenhum destes estudos encontrou correlação com a sobrevida dos pacientes com NSCLC. Para o nosso conhecimento, nosso estudo foi o

primeiro a correlacionar a diminuição da expressão do miR-15a com pior sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas pulmonar.

A expressão aumentada do miR-25 foi associada com progressão tumoral e tem implicação prognóstica em pacientes do sexo feminino com adenocarcinoma de pulmão (104). Em um estudo recente, o miR-25 estava com expressão aumentada em pacientes com tumores radio-resistentes e foi capazes de modular a apoptose celular induzida por radiação (105). O miR-25 foi identificado como o miRNA mais provável em predizer a sobrevida em pacientes com SCLC (106). Esses achados sugerem que o miR-25 pode constituir um biomarcador prognóstico em carcinomas pulmonares.

O miR-196b tem sido identificado como marcador prognóstico, capaz de distinguir AdenoCa de SCC (107). Este achado tem demonstrado valor prognóstico para progressão de doença em câncer gástrico e glioblastoma (108, 109). Embora não houvesse nenhuma evidência de associação entre a expressão desregulada do miR-196b e a sobrevida global de pacientes com NSCLC, o gene codificador da Anexina 1, alvo molecular do miR-196b, foi correlacionado com o aumento de invasão celular e o pior prognóstico de pacientes com AdenoCa (110). Em carcinoma de mama humano, a família do miR-196 foi identificada como um potencial supressor de metástase (111). Interessantemente, os miRNAs podem desempenhar um papel duplo em doenças como o câncer, atuando como oncogenes ou genes supressores tumorais. Exemplos incluem o cluster miR-17-92, um cluster complexo que compreende os miRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a and miR-92-1 9 (112). Recentemente, Li et al. relataram que o miR-196 pode regular, simultaneamente ou sequencialmente, a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais em leucemia de linhagem mista (MLL) (113), indicando um mecanismo complexo de modulação da expressão gênica por miRNAs. Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que a expressão aumentada do miR-196b estava associada a uma pior sobrevida e com o tipo histológico AdenoCa.

Assim como o miR-196b, o miR-205 também foi identificado como um marcador capaz de distinguir AdenoCa de SCC (76, 107, 114-116). Além disso, o

miR-205 já foi estudado como possível marcador sérico candidato para o diagnóstico de NSCLC (117). Diferentemente dos nossos resultados, Markou *et al* não identificaram associação significativa entre a expressão aumentada do miR-205 e a sobrevida de pacientes com NSCLC (118). Outro estudo mostrou que a baixa expressão do miR-205 estava correlacionada com metástases linfonodais, provavelmente constituindo um supressor tumoral em câncer de mama (119, 120). Acredita-se que o miR-205 atue na tumorigênese pulmonar por meio da inativação do gene supressor tumoral *PTEN* (121). Nosso estudo seria o primeiro a mostrar uma associação entre a expressão aumentada do miR-205 e pior sobrevida dos pacientes com NSCLC.

Os estudos supracitados sugerem um potencial valor prognóstico para os miRNAs miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b e miR-411. Nossos resultados sugerem um papel importante dos miRNAs na patogênese molecular, na progressão clínica e no prognóstico de pacientes com NSCLC e destaca a possibilidade de existir uma assinatura de miRNAs com valor prognóstico para pacientes com NSCLC. Entretanto, o estabelecimento de uma assinatura prognóstica depende de validação dos nossos dados utilizando um grande número de amostras tumorais de pacientes com NSCLC.

A análise computacional dos nossos dados identificou que os miRNAs desregulados controlam a expressão de genes principalmente envolvidos em vias de sinalização na progressão tumoral. Adicionalmente, identificamos os miRNAs com papel biológico relevante no câncer. Dentre eles, os miRNAs miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708 e o miR-744 estavam significativamente relacionados com genes-alvo que desempenham funções em vias moleculares relevantes à tumorigênese pulmonar. As vias Ras-Raf-MeK e PI3K-AKT-mTOR estão diretamente ativadas e relacionadas com crescimento celular e progressão tumoral em pacientes com carcinoma pulmonar (3). Dados do TCGA mostraram que vias de sinalização ativadas pela mutação do *EGFR* foram encontradas em 11% dos tumores, pela mutação do *KRAS* em 32%, *PI3K* em 4%, *HER2* em 3% e *PTEN* em 3% das amostras avaliadas de pacientes com adenocarcinoma de pulmão (57). Em SCC, os dados indicam que as vias de sinalização da tumorigênese eram ativadas por

mutação nos genes: *TP53* em ~81% dos tumores, *PI3K* em 16%, *PTEN* em 15%, *EGFR* em 9%, *KRAS* em 3% e *HER2* em 4% dos casos (56).

As vias moleculares alteradas pela mutação desses genes levam à disfunções no controle do ciclo celular, resposta ao estresse oxidativo, mecanismos de apoptose e diferenciação celular em carcinoma pulmonar. Portanto, a identificação desses miRNAs desregulados (miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708 e o miR-744) envolvidos na regulação dos genes supressores tumorais e oncogenes supracitados pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para pacientes com NSCLC.

A heterogeneidade genética tumoral pode ser considerada como uma das principais razões de falhas nas respostas terapêuticas, pois pacientes com câncer de pulmão, que apresentam tumores de mesmo estadiamento clínico e subtipo histológico, podem evoluir de forma diferente. Na era da medicina de precisão, a identificação de moléculas, tais como os miRNAs, com valor prognóstico e preditivo, é de extrema importância para guiar os médicos na determinação do melhor tratamento. A combinação de dados clínicos e a informação molecular seria portanto de fundamental importância para planejamento terapêutico.

A avaliação do perfil molecular de pacientes com carcinoma pulmonar NSCLC permitirá selecionar aqueles que são mais prováveis de se beneficiarem de uma terapia e guiar o desenvolvimento de agentes mais efetivos para um determinado perfil de carcinoma pulmonar. A identificação de uma assinatura com a expressão diminuída do miR-15a e do miR-411 e a expressão aumentada do miR-25, do miR-205 e do miR-196b, correlacionada com sobrevida, pode ter o potencial de identificar um subgrupo de pacientes com pior prognóstico.

Nosso estudo identificou miRNAs desregulados e seus genes-alvo potenciais em pacientes com NSCLC. Os dados apresentados podem ajudar a organizar um painel de miRNAs específicos para a elaboração de estratégias de validação e estudos clínicos. Estes dados podem contribuir para o desenvolvimento de terapias mais precisas para uma doença tão letal como o NSCLC.

7. Referências Bibliográficas

1. Sriamporn S, Parkin DM, Pisani P, Vatanasapt V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard P, et al. A prospective study of diet, lifestyle, and genetic factors and the risk of cancer in Khon Kaen Province, northeast Thailand: description of the cohort. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2005;6(3):295-303.
 2. Juergens RA, Brahmer JR. Adjuvant treatment in non-small cell lung cancer: Where are we now? *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2006;4(6):595-600.
 3. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(13):1367-80.
 4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(1):5-29.
 5. Silva JAG. Incidência de Câncer no Brasil 2014. Ministério da saúde. 2014.
 6. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *The Lancet Oncology*. 2002;3(8):461-9.
 7. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical research in toxicology*. 2001;14(7):767-90.
 8. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(14):1194-210.
 9. Barry SA, Tammemagi MC, Penek S, Kassan EC, Dorfman CS, Riley TL, et al. Predictors of adverse smoking outcomes in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(21):1647-59.
-

-
10. Perez-Soler R. Individualized therapy in non-small-cell lung cancer: future versus current clinical practice. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S38-45.
 11. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet Oncology*. 2013;14(13):1262-3.
 12. Humans IWGotEoCRt. Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2012;100(Pt C):11-465.
 13. Delva F, Andujar P, Lacourt A, Brochard P, Pairon JC. [Occupational risk factors for lung cancer]. *Revue des maladies respiratoires*. 2015.
 14. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(8):992-1001.
 15. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(9):1243-60.
 16. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(12):2893-917.
 17. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA oncology*. 2015;1(4):505-27.
-

18. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(36):13306-11.
 19. Cardarella S, Johnson BE. The impact of genomic changes on treatment of lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(7):770-5.
 20. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012;16 Suppl 2:S17-27.
 21. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(12):849-64.
 22. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316(5827):1039-43.
 23. Howlader N, Noone AM, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012 Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2015 [cited 2015 12 dec]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/.
 24. Non-Small Cell Lung Cancer, version 4.2015. NCCN Clinical Practices Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). 2015.
 25. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;346(2):92-8.
-

-
26. Pisters KM, Evans WK, Azzoli CG, Kris MG, Smith CA, Desch CE, et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non-small-cell lung cancer guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(34):5506-18.
 27. Masters GA, Temin S, Azzoli CG, Giaccone G, Baker S, Jr., Brahmer JR, et al. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(30):3488-515.
 28. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2004;350(21):2129-39.
 29. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *The New England journal of medicine*. 2010;362(25):2380-8.
 30. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(2):123-32.
 31. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(2):213-22.
 32. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-6.
-

-
33. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *The Lancet Oncology*. 2011;12(11):1004-12.
 34. Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, et al. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer research*. 1988;48(20):5738-41.
 35. Rodenhuis S, van de Wetering ML, Mooi WJ, Evers SG, van Zandwijk N, Bos JL. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *The New England journal of medicine*. 1987;317(15):929-35.
 36. Hoque MO, Brait M, Rosenbaum E, Poeta ML, Pal P, Begum S, et al. Genetic and epigenetic analysis of erbB signaling pathway genes in lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2010;5(12):1887-93.
 37. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in chest medicine*. 2011;32(4):703-40.
 38. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(7):823-59.
 39. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363(18):1693-703.
-

-
40. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2013;5 Suppl 5:S479-90.
 41. Tichellar JW LG. Lung Cancer. *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer: Taylor & Francis Group* 2006; 2006. p. 319-40.
 42. Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(8):1112-21.
 43. Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(5):1647-53.
 44. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(4):1167-76.
 45. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(18):5731-4.
 46. Subramanian J, Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *The Lancet Oncology*. 2008;9(7):676-82.
 47. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;361(10):958-67.
-

-
48. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba, II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(5):339-46.
 49. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *The New England journal of medicine*. 2005;353(2):133-44.
 50. Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Janne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(15):2442-9.
 51. Gridelli C, Solange P, Sgambato A, Casaluze F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer treatment reviews*. 2013.
 52. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(26):4247-53.
 53. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(8):863-70.
 54. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(21):1963-71.
-

-
55. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455(7216):1069-75.
 56. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-25.
 57. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-50.
 58. Chang JT, Lee YM, Huang RS. The impact of the Cancer Genome Atlas on lung cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015;166(6):568-85.
 59. 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.
 60. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(34):5848-56.
 61. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
 62. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Current opinion in genetics & development*. 2005;15(4):410-5.
 63. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene*. 2006;25(46):6220-7.
-

-
64. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2005;353(17):1793-801.
 65. Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(6):1126-33.
 66. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1721-6.
 67. miRBase: the microRNA database 2013. Available from: <http://www.mirbase.org/>.
 68. Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(10):E1106-15.
 69. Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet*. 2013;382(9893):720-31.
 70. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer research*. 2007;67(4):1424-9.
 71. Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene therapy*. 2011;18(12):1121-6.
-

-
72. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010;327(5962):198-201.
 73. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*. 2013;368(18):1685-94.
 74. Su J, Baigude H, McCarroll J, Rana TM. Silencing microRNA by interfering nanoparticles in mice. *Nucleic acids research*. 2011;39(6):e38.
 75. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(2):430-41.
 76. Bishop JA, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(2):610-9.
 77. Zhang YK, Zhu WY, He JY, Chen DD, Huang YY, Le HB, et al. miRNAs expression profiling to distinguish lung squamous-cell carcinoma from adenocarcinoma subtypes. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2012;138(10):1641-50.
 78. Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer research*. 2010;70(1):36-45.
 79. Raponi M, Dossey L, Jatkoa T, Wu X, Chen G, Fan H, et al. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer research*. 2009;69(14):5776-83.
-

-
80. Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, et al. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene*. 2011;30(32):3489-501.
 81. Wang Q, Zhong M, Liu W, Li J, Huang J, Zheng L. Alterations of microRNAs in cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells (A549/DDP). *Experimental lung research*. 2011;37(7):427-34.
 82. Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(7):417-30.
 83. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine*. 2005;2(1):e17.
 84. Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz JC, Liu N, et al. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(26):4268-75.
 85. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(4):857-65.
-

-
86. Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008;19(6):1053-9.
 87. Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(9):5731-41.
 88. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(29):12085-90.
 89. Li J, Li X, Ren S, Chen X, Zhang Y, Zhou F, et al. miR-200c overexpression is associated with better efficacy of EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer patients with EGFR wild-type. *Oncotarget*. 2014;5(17):7902-16.
 90. Saito M, Shiraishi K, Matsumoto K, Schetter AJ, Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, et al. A three-microRNA signature predicts responses to platinum-based doublet chemotherapy in patients with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(18):4784-93.
 91. Petriella D, De Summa S, Lacalamita R, Galetta D, Catino A, Logroscino AF, et al. miRNA profiling in serum and tissue samples to assess noninvasive biomarkers for NSCLC clinical outcome. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
-

-
92. Robles AI, Arai E, Mathe EA, Okayama H, Schetter AJ, Brown D, et al. An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma Based on mRNA, microRNA, and DNA Methylation Biomarkers. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(7):1037-48.
 93. 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.
 94. Pagano M, Gauvreau K. *Princípios de Bioestatística*. São Paulo: Cengage Learning; 2004.
 95. Kotlyar M, Pastrello C, Sheahan N, Jurisica I. Integrated interactions database: tissue-specific view of the human and model organism interactomes. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D536-41.
 96. Zhang WC, Liu J, Xu X, Wang G. The role of microRNAs in lung cancer progression. *Medical oncology*. 2013;30(3):675.
 97. Gilad S, Lithwick-Yanai G, Barshack I, Benjamin S, Krivitsky I, Edmonston TB, et al. Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012;14(5):510-7.
 98. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*. 2004;64(11):3753-6.
 99. Barille-Nion S, Bah N, Vequaud E, Juin P. Regulation of cancer cell survival by BCL2 family members upon prolonged mitotic arrest: opportunities for anticancer therapy. *Anticancer research*. 2012;32(10):4225-33.
-

-
100. Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, Faquin WC, Clark JR, Begum S, et al. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(5):1645-54.
 101. Bozok Cetintas V, Tetik Vardarli A, Duzgun Z, Tezcanli Kaymaz B, Acikgoz E, Aktug H, et al. miR-15a enhances the anticancer effects of cisplatin in the resistant non-small cell lung cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
 102. Tafsiri E, Darbouy M, Shadmehr MB, Zagryazhkaya A, Alizadeh J, Karimipour M. Expression of miRNAs in non-small-cell lung carcinomas and their association with clinicopathological features. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(3):1603-12.
 103. Druz A, Chen YC, Guha R, Betenbaugh M, Martin SE, Shiloach J. Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines. *RNA biology*. 2013;10(2):287-300.
 104. Xu FX, Su YL, Zhang H, Kong JY, Yu H, Qian BY. Prognostic implications for high expression of MiR-25 in lung adenocarcinomas of female non-smokers. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(3):1197-203.
 105. He Z, Liu Y, Xiao B, Qian X. miR-25 modulates NSCLC cell radio-sensitivity through directly inhibiting BTG2 expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;457(3):235-41.
 106. Yang T, Chen T, Li Y, Gao L, Zhang S, Wang T, et al. Downregulation of miR-25 modulates non-small cell lung cancer cells by targeting CDC42. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(3):1903-11.
-

-
107. Hamamoto J, Soejima K, Yoda S, Naoki K, Nakayama S, Satomi R, et al. Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Molecular medicine reports*. 2013;8(2):456-62.
 108. Lim JY, Yoon SO, Seol SY, Hong SW, Kim JW, Choi SH, et al. Overexpression of miR-196b and HOXA10 characterize a poor-prognosis gastric cancer subtype. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(41):7078-88.
 109. Ma R, Yan W, Zhang G, Lv H, Liu Z, Fang F, et al. Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PloS one*. 2012;7(6):e38096.
 110. Liu YF, Zhang PF, Li MY, Li QQ, Chen ZC. Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 2011;28(5):413-25.
 111. Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M, et al. Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer research*. 2010;70(20):7894-904.
 112. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current genomics*. 2010;11(7):537-61.
 113. Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nature communications*. 2012;3:688.
 114. Patnaik S, Mallick R, Kannisto E, Sharma R, Bshara W, Yendamuri S, et al. MiR-205 and MiR-375 microRNA assays to distinguish squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung cancer biopsies. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(3):446-53.
-

115. Solomides CC, Evans BJ, Navenot JM, Vadigepalli R, Peiper SC, Wang ZX. MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis. *Acta cytologica*. 2012;56(6):645-54.
 116. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(12):2030-7.
 117. Jiang M, Zhang P, Hu G, Xiao Z, Xu F, Zhong T, et al. Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;383(1-2):67-75.
 118. Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clinical chemistry*. 2008;54(10):1696-704.
 119. Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu CG, Palazzo JP, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *The Journal of pathology*. 2009;219(2):214-21.
 120. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell research*. 2009;19(4):439-48.
 121. Lei L, Huang Y, Gong W. miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. *Oncology reports*. 2013;30(6):2897-902.
-

8. Apêndice

8.1. Apêndice 1

Figura Suplementar 1. Amplificação dos controles endógenos (RNU-44, RNU-48 e U6) em 38 amostras de tumor e 3 *pools* de 9 amostras de tecido normal (*pool* 1, 2 e 3). Na figura, *sample* = amostra.

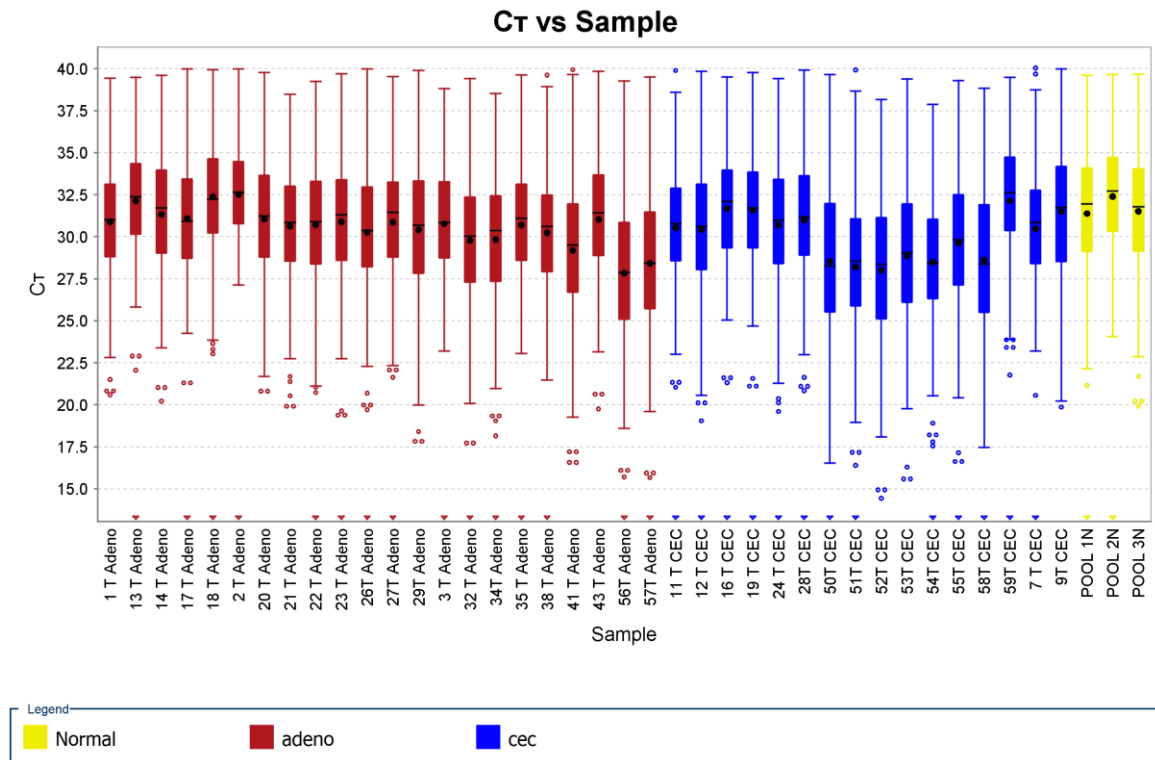
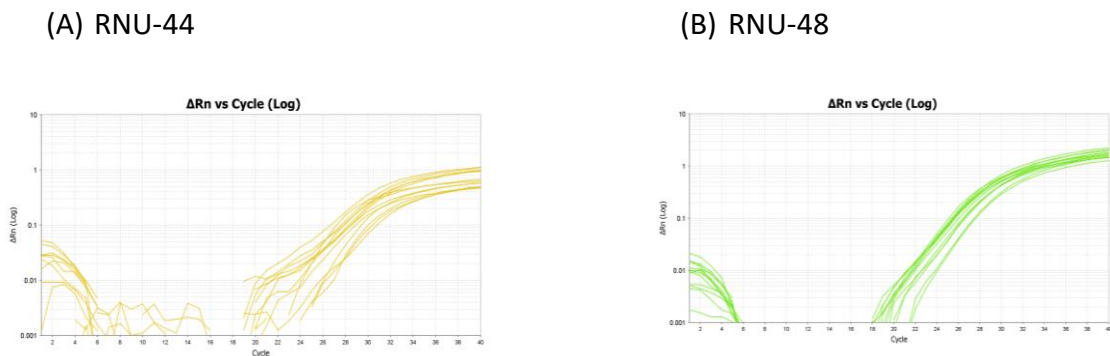
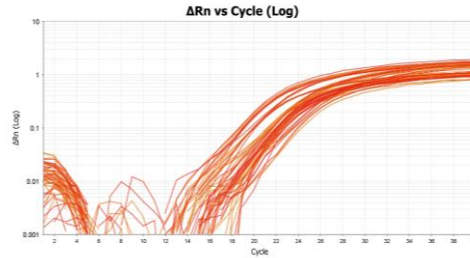


Figura Suplementar 2. Curvas de amplificação dos miRNAs endógenos.



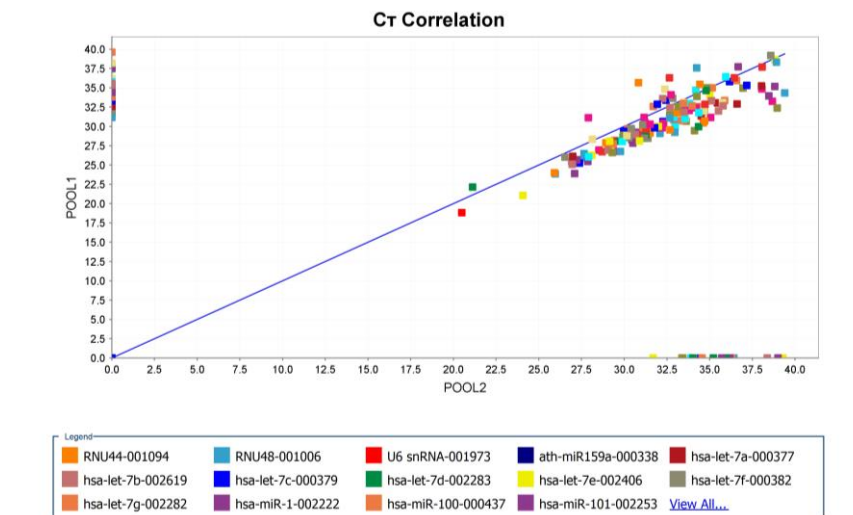
(C) U6 RNA nucleolar pequeno



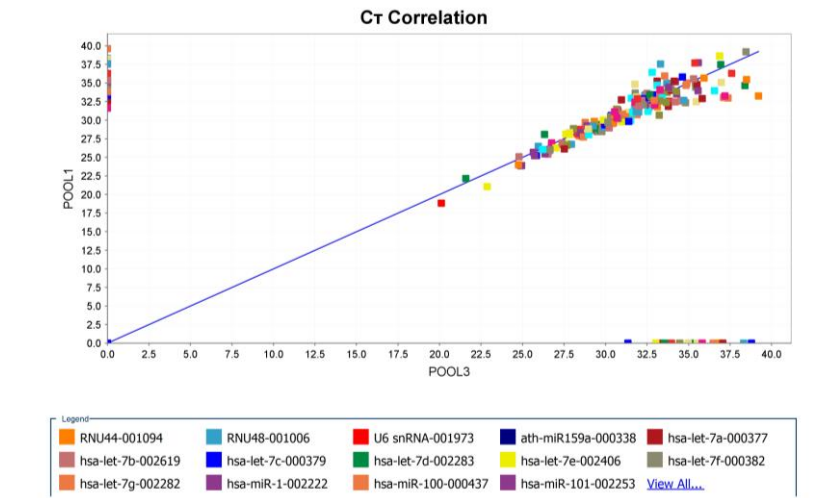
Na Figura acima, o eixo x representa o número de ciclos na PCR quantitativa em tempo real e o eixo y representa a intensidade de fluorescência detectada (em log₁₀).

Figura Suplementar 3. Correlação entre os perfis de expressão de miRNAs nos três diferentes *pools*. Cada pool é composto por três amostras normais diferentes. Portanto, os três pools representam um total de nove amostras de tecido pulmonar normal.

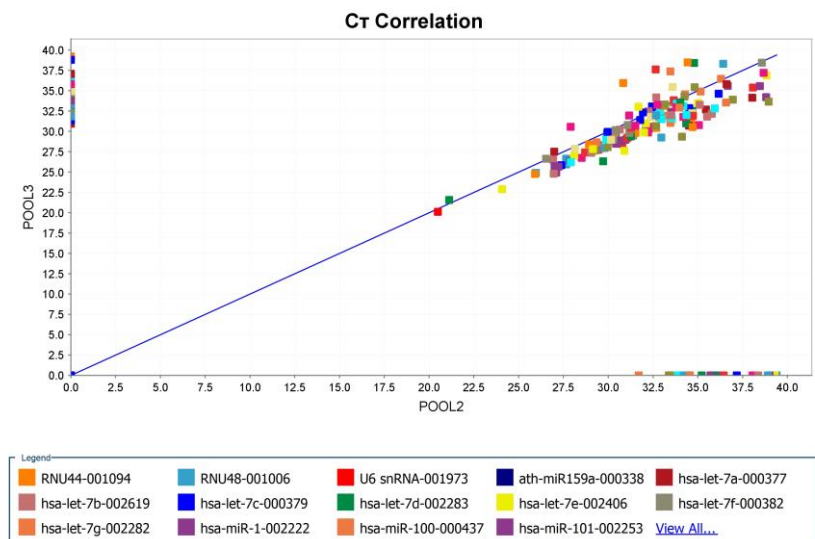
a) Pool 1 vs. 2



b) Pool 1 vs. 3

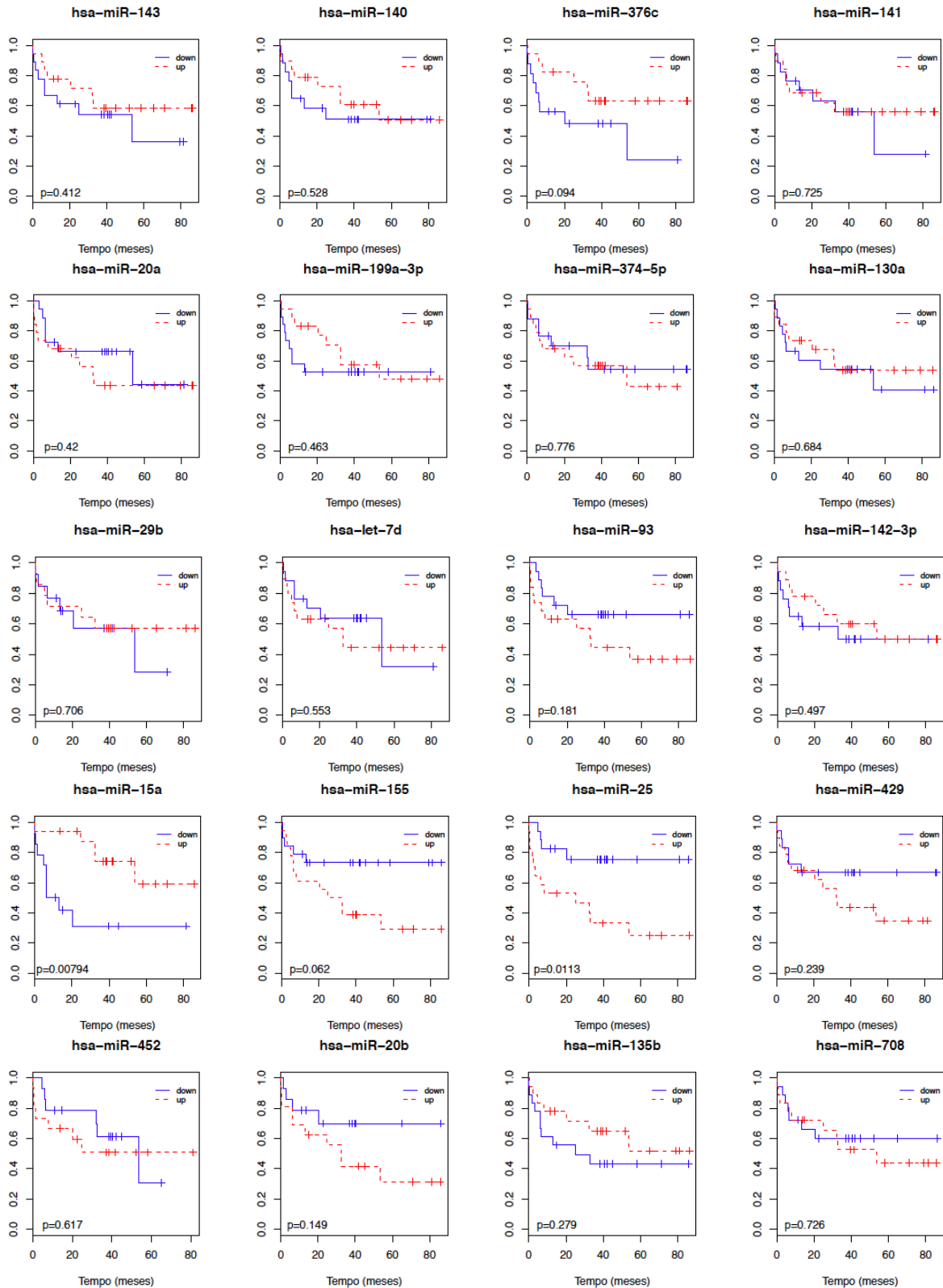


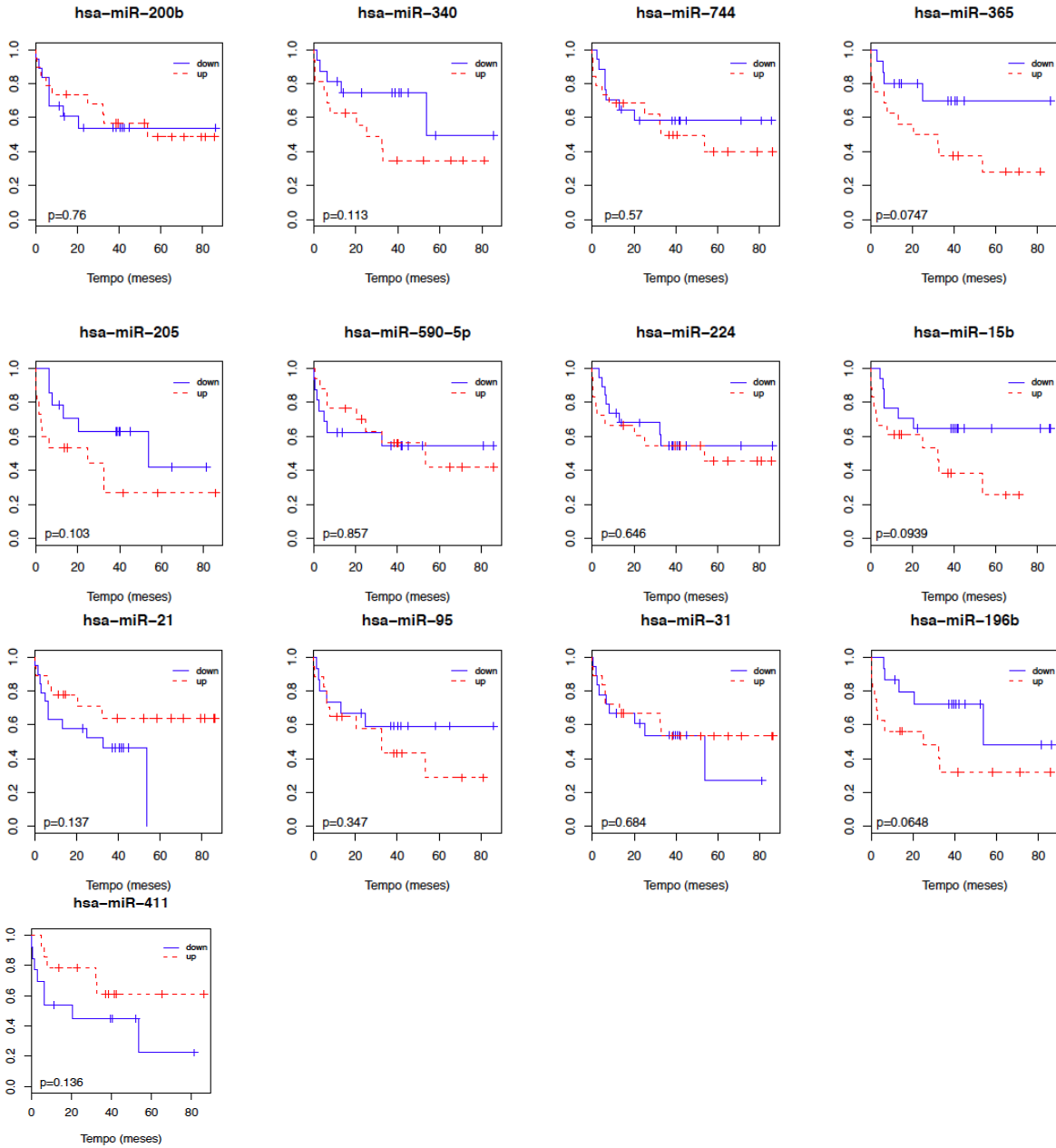
c) Pool 2 vs. 3



8.2. Apêndice 2

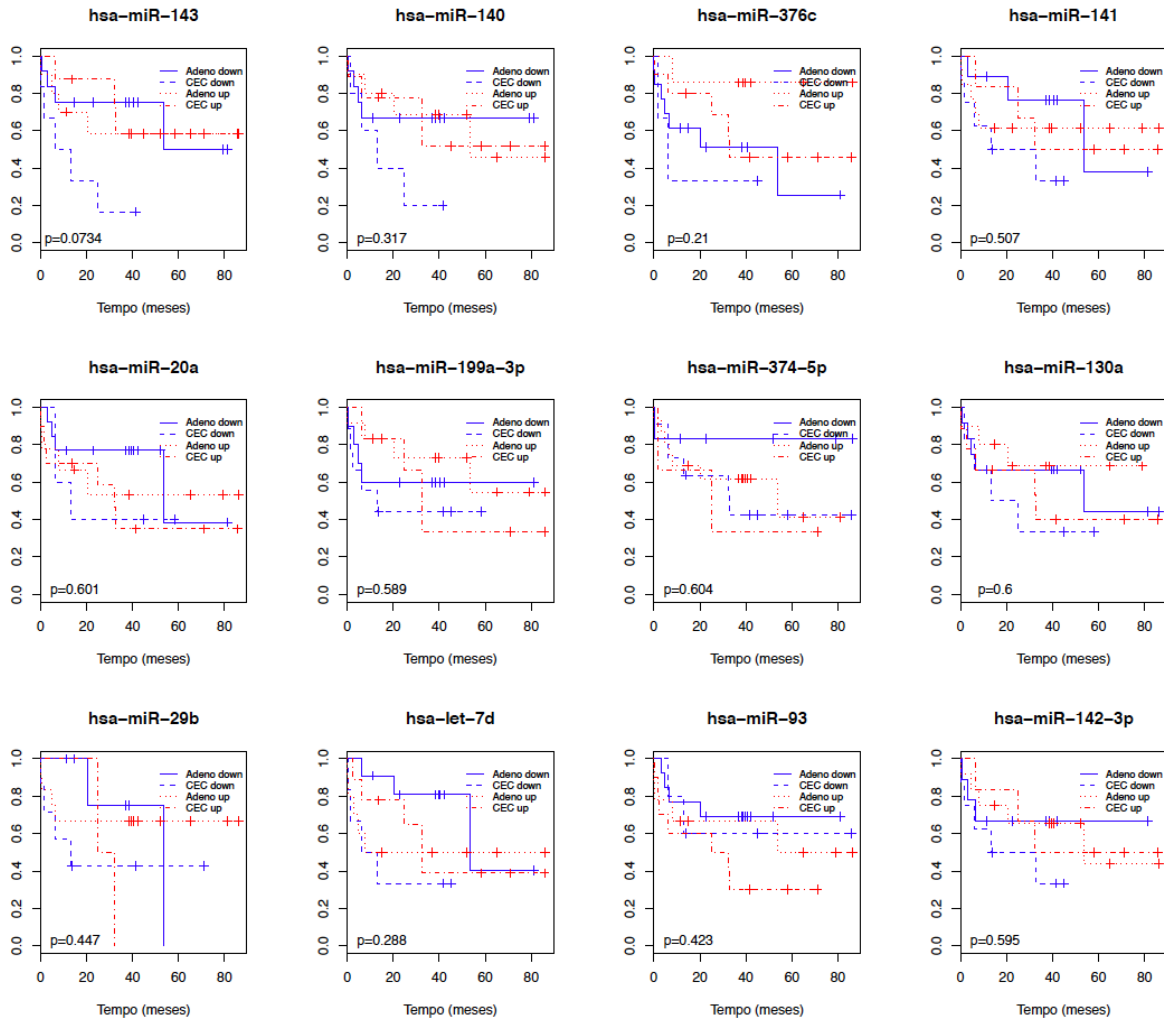
Figura Suplementar 4. Kaplan-Meier plots gerados pela análise de expressão de miRNAs e sobrevida global dos pacientes independente do subtipo histológico.

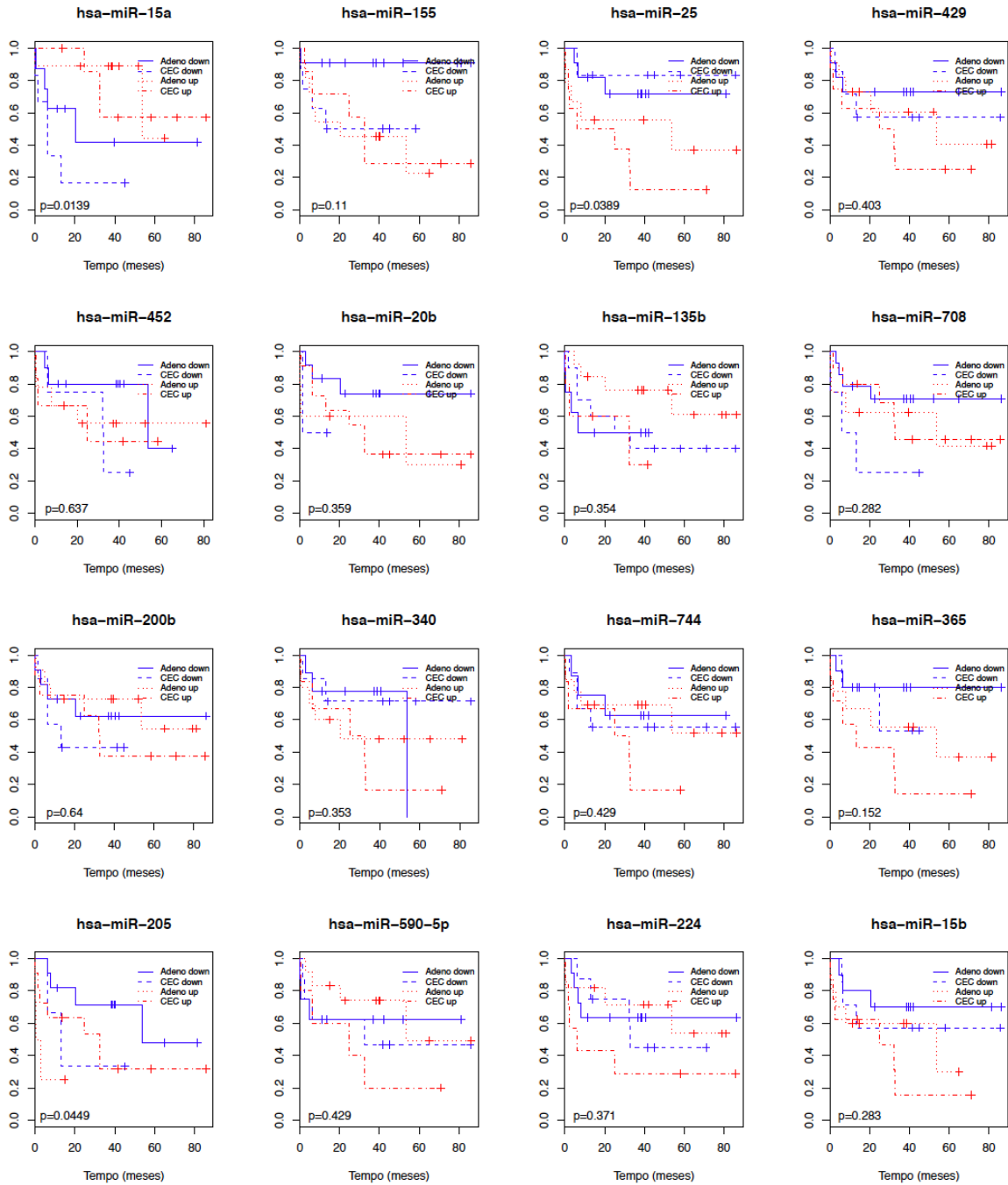


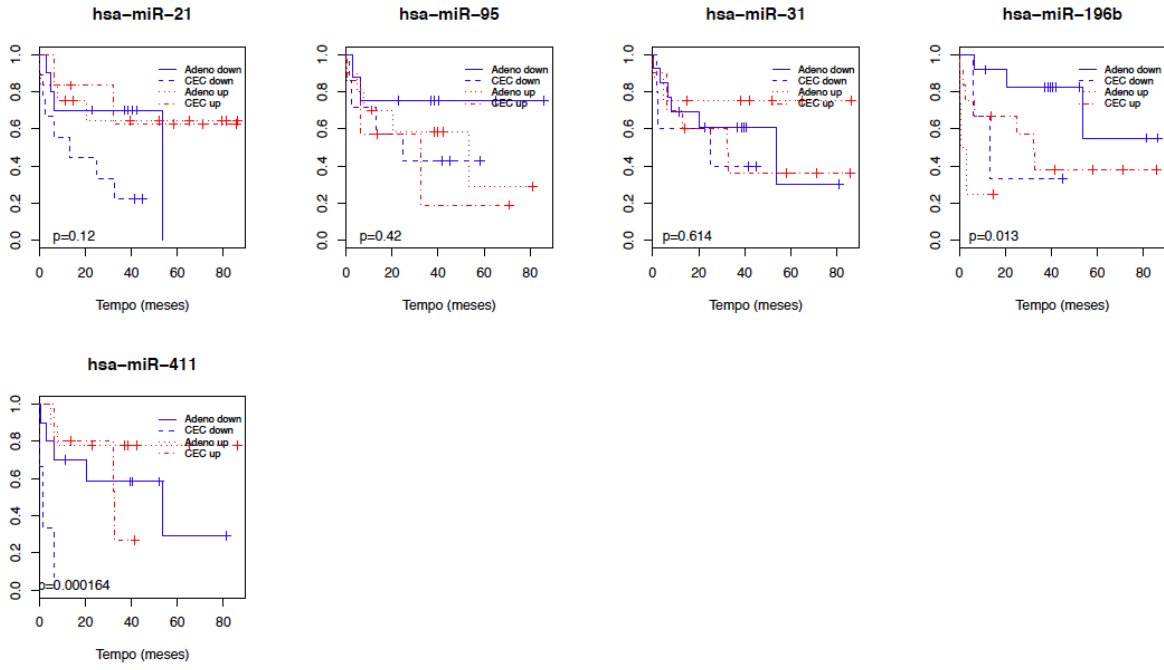


8.3. Apêndice 3

Figura Suplementar 5. Kaplan-Meier plots gerados pela análise de expressão de miRNAs e sobrevida global dos pacientes com AdenoCa e SCC.

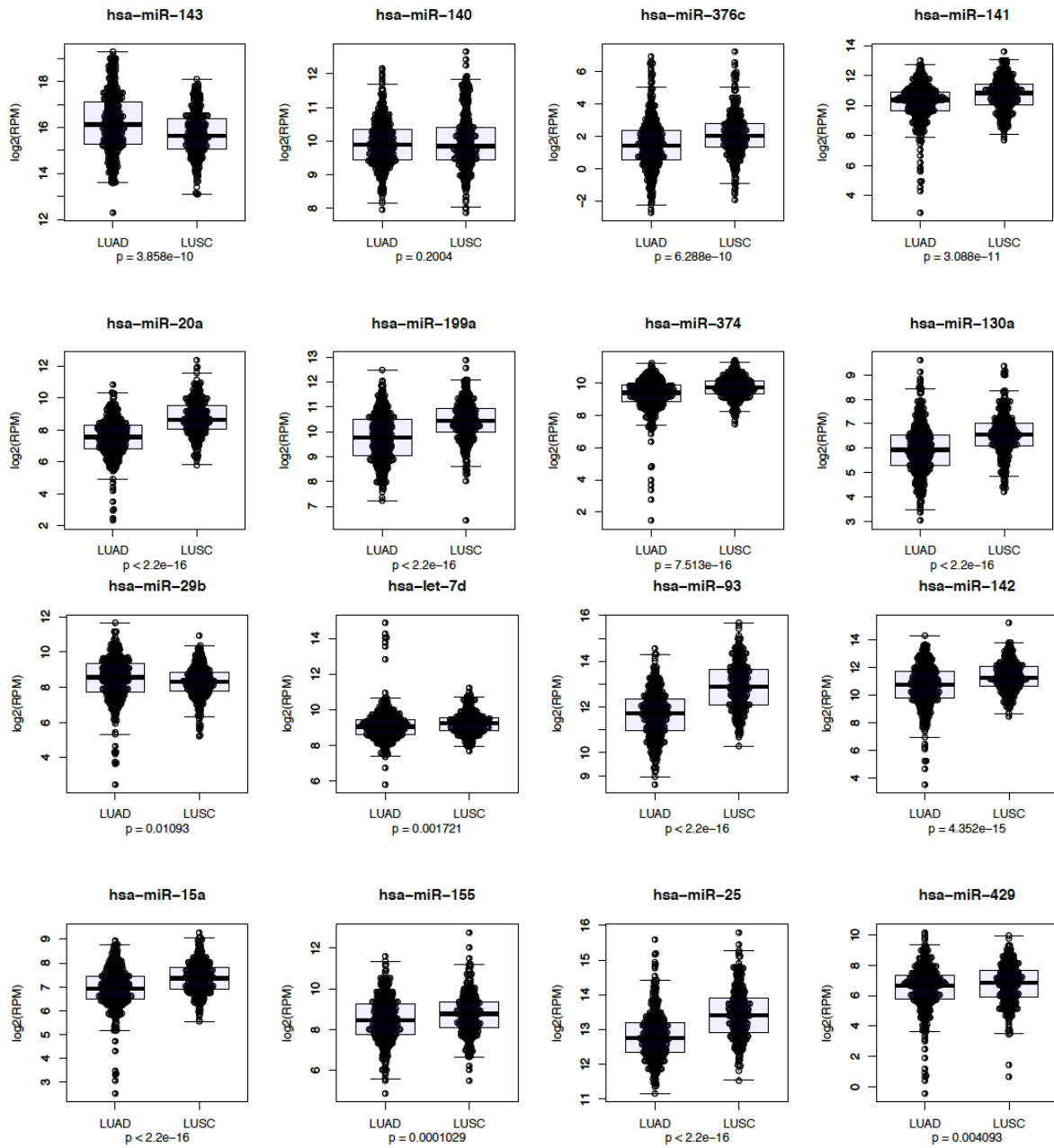


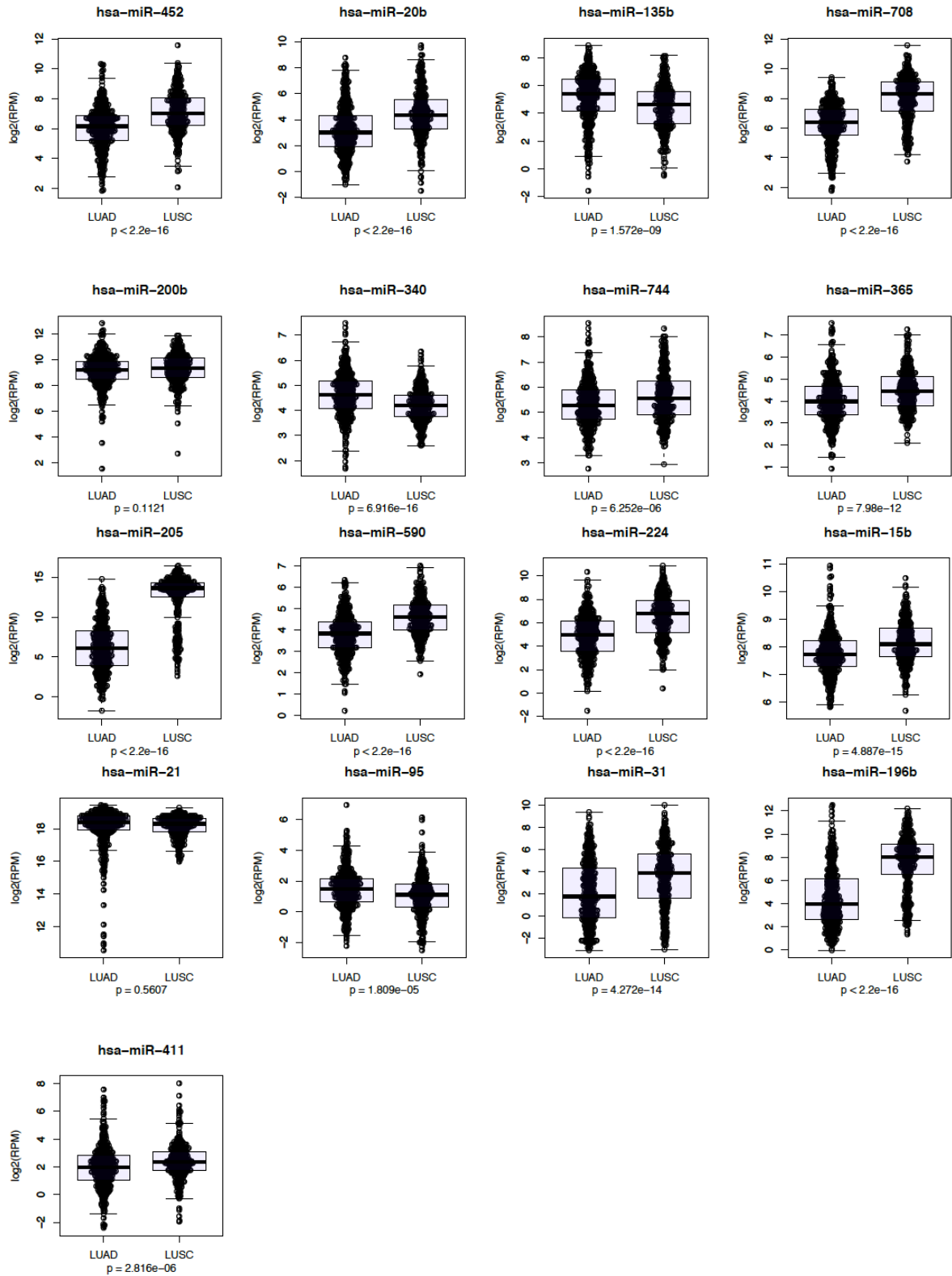




8.4. Apêndice 4

Figura Suplementar 6. Dados de expressão de miRNAs de acordo com o TCGA.





9. Anexo

Identification of a microRNA signature associated with survival of patients with lung cancer.

Cristiano P. Souza^{1,2}, Naiara C. Cinegaglia¹, Tainara F. Felix¹, Adriane F. Evangelista², Tomas Tokar³, Rogério A. Oliveira⁴, Erica N. Hasimoto¹, Daniele C. Cataneo¹, Antônio J. M. Cataneo¹, Igor Jurisica³, Márcia M. C. Marques^{2,5}, Patricia P. Reis^{1,6*}.

¹Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil

³Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada

⁴Department of Biostatistics, Biosciences Institute, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

⁵Barretos School of Health Sciences, Barretos, São Paulo, Brazil

⁶Experimental Research Unity (UNIPEX), Faculty of Medicine, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

Corresponding author

Patricia Reis, Ph.D.
Assistant Professor
Dept. of Surgery and Orthopedics
Faculty of Medicine
São Paulo State University (UNESP)
Av. Prof. Montenegro, S/N.
Botucatu, SP, 18618-970. BRAZIL
Phone: +55 (14) 3880-1635
Email: preis@fmb.unesp.br

Keywords: lung cancer, microRNAs, prognostic biomarkers, molecular targets.

ABSTRACT

Although the advances in diagnostic and treatment strategies, including the development of molecularly-targeted therapies, lung cancer remains as the leading cause of cancer-related deaths, worldwide, with survival rates as low as 16% in developed countries. Low survival rates are mainly due to late diagnosis and the lack of effective treatment. The identification of novel biomarkers is thus needed for the development of new therapies for patients with advanced disease. microRNAs (miRNAs) are promising molecules, as they comprise a class of non-coding RNAs that regulate gene expression and have been indicated as clinically valuable diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in cancer. Herein, we applied global miRNA expression analysis using TaqMan® arrays in paired tumor and normal lung tissues (N=38) from patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) from the two main histological types of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. We identified 33 significantly deregulated miRNAs ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) in tumors relative to normal samples. 8/33 deregulated miRNAs (miR-20a, miR-20b, miR-93-5p, miR-205, miR-374-5p, miR-376, miR-708 and miR-196b) were differentially expressed between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. miRNAs miR-20a and miR-93 were differentially expressed in tumors from smokers vs. non-smokers. Low expression of miR-15a and miR-411 and high expression of miR-25, miR-205 and miR-196b were significantly associated ($p < 0,05$) with worse patient survival. We suggest that miRNAs miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b and miR-411 may represent prognostic biomarkers in NSCLC. Our data are valuable for the development of validation studies using large patient cohorts, in order to confirm the value of the identified miRNAs as prognostic biomarkers in NSCLC.

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Current incidence data estimates 1.6 million new cases/year, with 62% of cases occurring in developed countries, mainly in North America and the Western countries, and 38% in developing countries (4). In Brazil, incidence data estimates the occurrence of approximately 27,000 new cases/year (122). The 5-year survival rate remains low at approximately 16,8%. These low survival rates are mainly due to late diagnosis, with only 15% of patients being diagnosed with localized disease, 22% of patients with regional, lymph node metastasis, 57% with distant metastasis and 6% with undetermined disease stage (23).

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) comprise the majority (~85%) of cases, and the two major histological subtypes are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

Invasive adenocarcinoma is further classified into histological subtypes of lepidic, solid, acinar, papillary and micropapillary; the latter have been associated with a worse prognosis (14).

The main risk factor is tobacco exposure (8) among other factors such as hormonal changes and viruses (Human Papilloma virus), the latter mainly among Asian patients (123). The initial malignant transformation of the normal lung epithelium occurs due to genetic and epigenetic changes, including mutations, loss of heterozygosity and tumor suppressor and DNA repair gene promoter methylation, as well as transcriptome changes, inflammation and evasion of apoptosis (124, 125). Such changes are mainly associated with transformation of normal lung epithelium to hyperplasia, metaplasia and dysplasia, followed by an accumulation of genetic and epigenetic changes leading to progression to carcinoma *in situ* and invasive carcinoma with metastatic potential (126-128).

It is well known that NSCLC from different histologies have distinct molecular genetic profiles, such as mutations affecting oncogenes such as *EGFR*, *K-RAS*, *ALK*, *BRAF* and *HER-2* and tumor suppressor genes such as *TP53* (37). Although the development of molecularly-targeted therapies including *EGFR* tyrosine kinase inhibitors, such treatments have benefited only a small fraction of patients with lung adenocarcinoma. The majority of patients with advanced disease are still treated with empiric chemotherapy regimens and survival rates remain low.

Global efforts have been made to determine actionable mutations in lung adenocarcinoma, including data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (57) and the Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC) (129). Such efforts have mapped mutations and their frequency in tumors and demonstrated that mutations in oncogenes such as *EGFR*, *K-RAS*, *ALK* and *BRAF* occur in >60% of lung adenocarcinomas. These data demonstrate the importance of tumor genotyping to tailor patient treatment, since many of those genetic mutations are currently targetable by tyrosine kinase inhibitors.

Additional studies have identified genes involved in signaling pathways, which may be useful as novel targets for treatment development in NSCLC (56-58). Although these studies, there is still a need to identify biomarkers clinically useful for molecular diagnostics, and to determined patient prognosis and response to treatment.

In the past decade, microRNAs (miRNAs) have been discovered as potent gene expression regulators (130) with an important role in disease development. Previous

studies have shown global deregulated miRNA expression profiles in lung cancer *vs.* normal lung tissues (131).

Herein, we assessed miRNA global expression profiles in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, using a TaqMan array platform. Our data showed that deregulated miRNA expression is associated with relevant clinical and histopathological data, and patient outcome/survival.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and to national and international ethics guidelines. Our study has been approved by the Research Ethics Boards of the Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP (4319/2012) and Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP (75907).

Patient samples

58 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were obtained from patients diagnosed with NSCLC (adenocarcinoma and squamous cell carcinoma subtypes) and who have undergone surgery for treatment, from 2007-2012, at Botucatu Clinical Hospital and Barretos Cancer Hospital, SP, Brazil. All 58 samples were subjected to RNA extraction. Of these, 19 samples were excluded due to low RNA concentration and one sample was excluded since it was a metastasis and not a primary tumor. An additional 9 histologically normal lung tissues, adjacent to the tumor, were collected and used as controls. Clinical and histopathological characteristics were obtained from medical records including age at diagnosis, gender, date of surgery, history of tobacco and alcohol exposure, disease grade and stage, type of primary treatment and/or adjuvant and/or palliative treatment, last date of follow-up, outcome. These data are shown in Table 1.

RNA Extraction

Samples obtained from FFPE tissue blocks were subjected to RNA extraction using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following a previously reported protocol with modifications to improve RNA yield [45]. RNA samples were quantified using *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and quality was assessed using *Bionalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), following the manufacturer's protocol. RNA samples were stored at -80°C until use for miRNA expression analysis.

microRNA expression profiling analysis

miRNA expression was assessed by using the TaqMan® Array Human MicroRNA platform (Life Technologies, Foster City, CA, USA), as previously described by us (132).

Briefly, the reverse transcription mix was prepared using the Megaplex primers, followed by preparation of the quantitative PCR mix (containing 450 µL of amplification mix and 6 µL of newly synthesized cDNA and added to 444 µL of nuclease-free ddH₂O (Sigma). 100 µL of this mix was added to the cards containing liophilized miRNA probes; the cards were then centrifuged and loaded into the QuantStudio 12K instrument (Life Technologies, Foster City, CA, USA). miRNA expression profiles were determined in a total of 41 samples (38 tumors and 3 pools of 9 histologically normal controls. Each pooled control contained 3 normal samples. Global data normalization was performed in Expression Suite software (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and miRNA expression profiles were determined using RQ Manager v.1.2 software (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Statistical analyses

Bioinformatic data analysis: Principle Component Analysis (PCA) of miRNA expression values was performed using the *ade4* and *EMA* packages in R. This multivariate analysis allowed us to evaluate tumor and normal clusters according to miRNA expression profiles. In addition, computational analysis of predicted miRNA target genes was performed using microRNA Data Integration Portal - mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>). Genes were mapped into proteins and Protein-Protein

Interaction (PPI) networks were constructed using Interologous Interaction Database (I2D) (<http://ophid.utoronto.ca/i2d>) and visualized using NAVIGaTOR (<http://ophid.utoronto.ca/navigator>). Our data were validated by comparing significantly deregulated miRNAs identified experimentally in our samples and predicted gene targets against published lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma miRNA and gene expression datasets from TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>). We used TCGA-Assembler tool (<http://www.compgenome.org/TCGA-Assembler/>) to download and process the datasets. miRNA-Seq datasets comprised a total of 561 lung adenocarcinomas and 523 squamous cell cancers. Gene expression (RNA-Seq) datasets comprised a total of 576 lung adenocarcinomas and 552 lung squamous cell carcinomas. Data were analyzed using the beeswarm package in R.

RESULTS

Patient characteristics

Table 1 summarizes the clinical and pathological characteristics of patients with lung carcinoma included in this study. Of the 38 samples, 23 were from patients diagnosed with adenocarcinoma and 15 from patients with SCC. Based on the new pathological classification of adenocarcinomas, we found the following subtypes: acinar (N = 9), solid (N = 5), papillary (N = 1), lepidic with acinar component (N = 4) and indeterminate (N = 4). The mean age of patients with adenocarcinoma was 60.9 years, with similar proportion of males and females (11 and 12, respectively). About 70% of cases had active smoking history or were former smokers. Patients with SCC had an average age of 62 years, with predominance of males (11 men and 4 women) and 93.3% had active smoking history or were former smokers.

Surgery was the main treatment strategy for 37/38 patients. One patient had stage IV diagnosis, thus was treated with chemotherapy exclusively. One patient died due to complications after surgery. Two patients developed tumor recurrence and one died of the disease before palliative chemotherapy. One third of the patients received adjuvant chemotherapy (8 Adenocarcinoma and 5 SCC) due to advanced loco-regional disease

(staging Ib, II or III). Of these 13 patients, 4 developed distant metastasis and required second line palliative chemotherapy and 2 died due to tumor recurrence.

microRNA expression profiles in lung carcinomas

The expression levels of 377 miRNAs were evaluated in tumor samples using RNU-44, RNU-48 and U6 as stable references and compared to pools of normal lung samples. Thirty-three miRNAs were detected as differentially expressed in tumors compared with normal samples, being 2 under-expressed and 31 over-expressed (Table 2, fold change ≥ 1.5 and $p < 0.05$). Seven microRNAs (miR-376, miR-20a, miR-20b, miR-374-5p, miR-93-5p, miR-708 and miR-205) were detected as differentially expressed between adenocarcinoma and SCC samples ($P < 0.05$, Table 3).

By comparing the microRNA levels in lung carcinomas according to clinical and histopathological features, we detected higher expression of miR-20a and miR-93 in tumors from smokers compared with non-smokers ($p < 0.05$). Additionally, over-expression of miR-29b and under-expression of miR-95 were associated to larger tumors and lymph node metastasis, respectively (Table 4).

Two out of 33 altered microRNAs were significantly associated with overall survival. The decreased expression of miR-15a and increased expression of miR-25 were associated with shorter survival in patients with lung carcinoma (Figure 1). Survival curves were also constructed evaluating adenocarcinoma and SCC samples separately. Decreased expression of miR-15a and miR-411 and increased expression of miR-25, miR-205 and miR-196b were significantly associated with decreased survival regardless of the histologic subtype (Figure 2). Interestingly, all these microRNAs were detected as differentially expressed between lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma using TGCA datasets (Figure 3).

Predicted miRNA target genes

We next evaluated the target genes potentially regulated by these altered miRNAs identified in lung carcinomas. This analysis revealed various target genes involved in important biological functions in tumorigenesis such as transcription control, translation, programmed cell death, among others (Table 5). We found that miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708 and miR-744 were

related to relevant pathways in tumorigenesis. The target genes regulated by miRNAs dysregulated in NSCLC (EGFR, NRAS, BRAF, PI3K, HER2 and RB1) are involved in signaling pathways in cancer. Interestingly, EGFR, TP53, RB1 and HER2 genes were associated with pathways associated with NSCLC histological type. Thus, our data indicate that the target genes predicted to be regulated by miRNAs are frequently deregulated in cancer, especially in NSCLC.

Table 1. Demographic data, risk factors and clinic-pathologic features in patients with adenocarcinoma and SCC.

Features	Adeno	SCC
Age		
Mean	60.91	62
Range	40 – 84	51 - 73
Sex – N (%)		
Male	11 (47.8)	11 (73.4)
Female	12 (52.2)	4 (26.6)
Smoking – N (%)		
No	7 (30.5)	1 (6.7)
Yes	16 (69.5)	14 (93.3)
Histological grade –N (%)		
1	1 (4.3)	1 (6.7)
2	14 (60.8)	6 (40)
3	7 (30.4)	5 (33.3)
Stage – N (%)		
I	9 (39.1)	4 (26.7)
II	6 (26.1)	4 (26.7)
III	8 (34.8)	6 (40)
IV	0	1 (6.6)
Number of previous therapies		
0	16	10
1	5	2
2	1	2
3	1	0
4	0	1
Death – N		
Cancer-specific	4	4
Global	7	9

Table 2. Significantly deregulated miRNAs in NSCLC.

microRNA	RQ	P-Value
hsa-miR-143-3p	0.326	0.000
hsa-miR-140-5p	0.369	0.049
hsa-miR-376c-3p	2.057	0.001
hsa-miR-141-3p	2.060	0.004
hsa-miR-20a-5p	2.107	0.003
hsa-miR-199a-3p	2.199	0.003
hsa-miR-374-5p	2.260	0.000
hsa-miR-130a-3p	2.414	0.000
hsa-miR-29b-3p	2.511	0.000
hsa-let-7d-5p	2.580	0.000
hsa-miR-93-5p	2.751	0.000
hsa-miR-142-3p	2.920	0.007
hsa-miR-15a-5p	3.016	0.017
hsa-miR-155-5p	3.056	0.005
hsa-miR-25-3p	3.371	0.000
hsa-miR-429	3.593	0.000
hsa-miR-452-5p	3.668	0.007
hsa-miR-20b-5p	3.917	0.000
hsa-miR-135b-5p	4.026	0.000
hsa-miR-708-5p	4.354	0.000
hsa-miR-200b-3p	4.446	0.000
hsa-miR-340-5p	5.345	0.000
hsa-miR-744-5p	5.649	0.000
hsa-miR-365-3p	5.766	0.000
hsa-miR-205-5p	5.856	0.001
hsa-miR-590-5p	6.112	0.001
hsa-miR-224-5p	6.692	0.000
hsa-miR-15b-5p	6.712	0.000
hsa-miR-21-5p	7.827	0.000
hsa-miR-95-3p	9.817	0.000
hsa-miR-31-5p	13.929	0.001
hsa-miR-196b-5p	16.525	0.001
hsa-miR-411-5p	25.909	0.033

RQ – relative quantification of each miRNA in tumor compared with normal lung samples.

Table 3. Differentially expressed miRNAs according to the histological subtypes of lung carcinomas.

microRNA	Adeno	SCC	p-value
miR-376	Underexpressed	Overexpressed	0.013
miR-20	Underexpressed	Overexpressed	0.02
miR-93-5p	Underexpressed	Overexpressed	0.02
miR-20b	Underexpressed	Overexpressed	0.017
miR-708	Underexpressed	Overexpressed	0.001
miR-205	Underexpressed	Overexpressed	0.0002
miR-374-5p	Overexpressed	Underexpressed	0.004

Table 4. Statistically significant correlations between miRNA expression and patient clinical data.

microRNA	Clinicopathological features		p-value
	Smoker	Non-smoker	
miR-20a	Overexpressed	Underexpressed	0.042
miR-93	Overexpressed	Underexpressed	0.042
	T1/T2	T3/T4	
miR-29b	Underexpressed	Overexpressed	0.018
	N0	N1-3	
miR-95	Overexpressed	Underexpressed	0.024

Table 5. Pathways and target genes potentially regulated by deregulated miRNAs in lung carcinoma.

Pathways	p-value (FDR)	miRNA	Target genes
Cancer pathways	<6.250e-05	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	<i>EGFR</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PI3K</i> <i>HER2</i> <i>RB1</i>
NSCLC	<1.235e-05	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	<i>EGFR</i> <i>TP53</i> <i>HER2</i> <i>RB1</i>
SCLC	2.79E-04	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	<i>PTEN</i> <i>TP53</i> <i>PI3K</i> <i>RB1</i>
miRNA in cancer	8.55E-04	miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708, miR-744	<i>TP53</i> <i>HER2</i> <i>EGFR</i> <i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>PTEN</i>

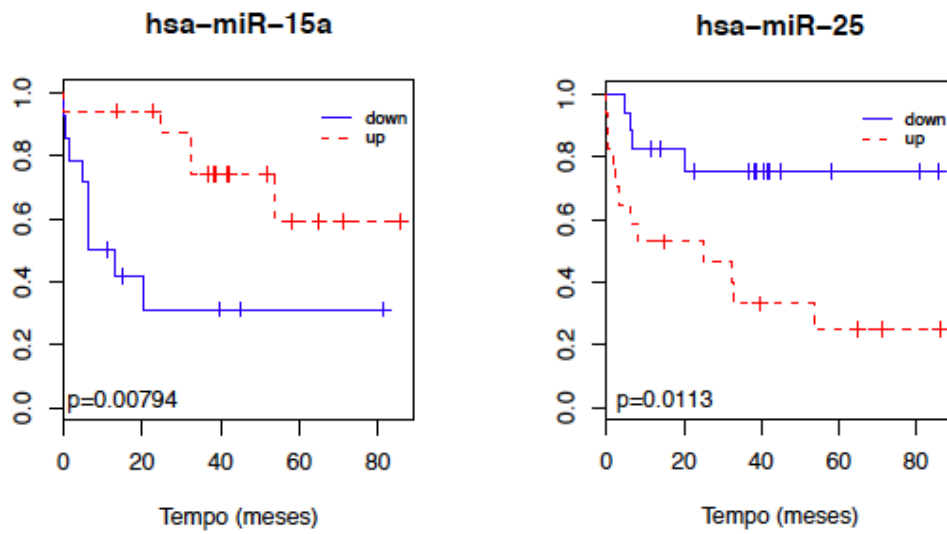


Figure 1 - Overall survival in patients with lung carcinoma according to miR-15a and miR-25 expression levels. Under-expression of miR-15a and over-expression of miR-25 were associated with shorter survival.

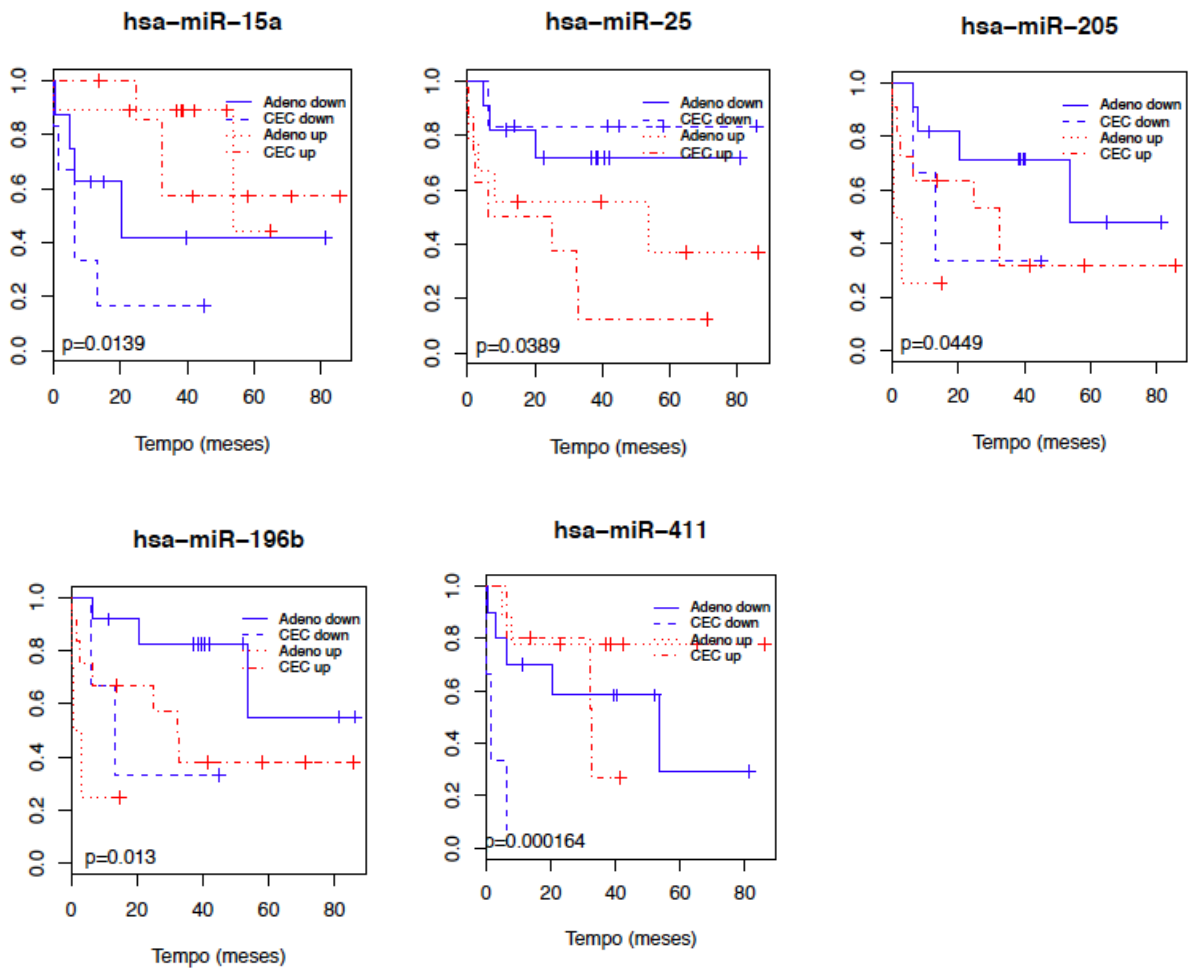


Figure 2 - Overall survival in patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma according to expression levels of miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b and miR-411.

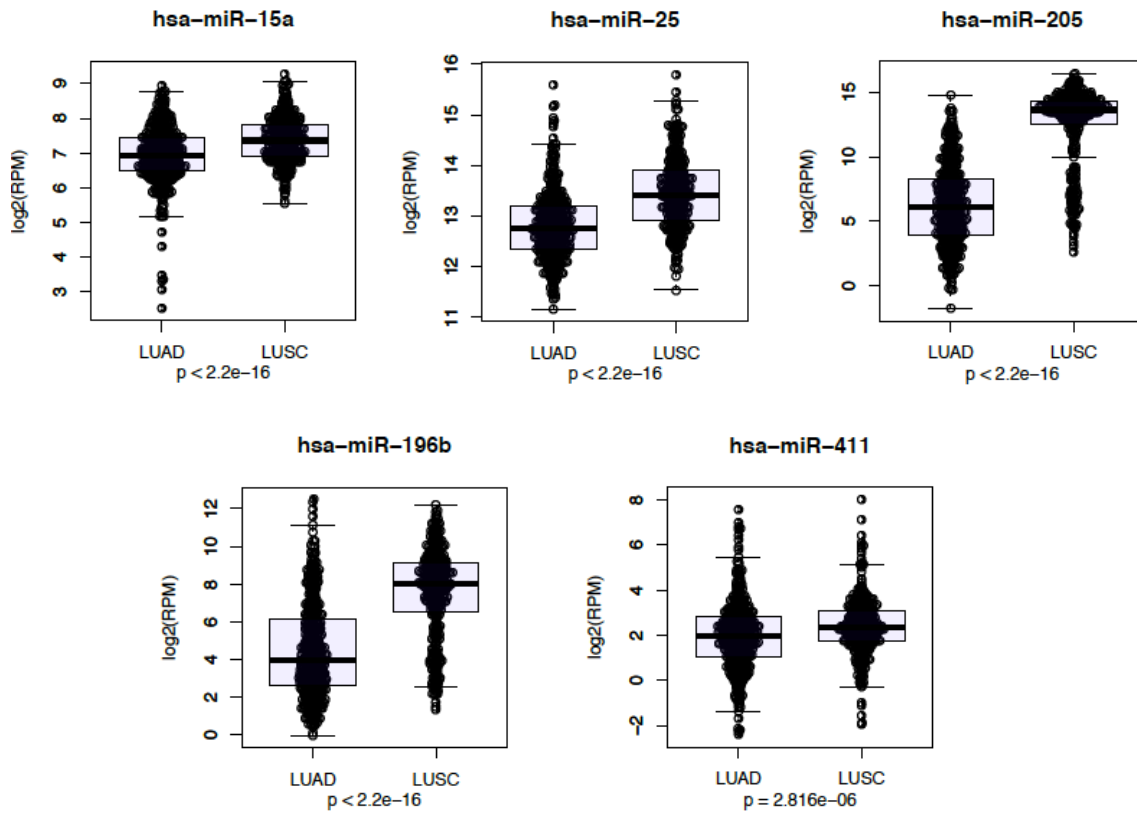


Figure 3 - Deregulated expression of miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b and miR-411 comparing lung adenocarcinoma (LUAD) and lung squamous cell carcinoma (LUSC) samples obtained from TCGA data.

DISCUSSION

miRNAs are potent gene expression regulators with a relevant role in tumorigenesis including lung cancer (96-98). miRNA alterations often lead to target gene deregulation and deregulated signaling pathways with roles in tumor development and progression.

Our main goals were to investigate global deregulated miRNA profiles in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, to identify and validate predicted target genes modulated by miRNAs and to correlate deregulated miRNA expression with relevant clinical information with focus on outcome/survival. Our main findings included the identification of 33 significantly deregulated miRNAs (miR-143, miR-140-5p, miR-376c, miR-141, miR-20a, miR-199a-3p, miR-374-5p, miR-130a, miR-29b, let-7d, miR-93-5p, miR-142-3p, miR-15a, miR-155, miR-25, miR-429, miR-452, miR-20b, miR-135b, miR-708, miR-200b, miR-340, miR-744, miR-365, miR-205, miR-590-5p, miR-224, miR-15b, miR-21, miR-95, miR-31, miR-196b and miR-411) in NSCLC samples compared to normal lung tissues. Interestingly, deregulated expression of two miRNAs (miR-15a and miR-25) was correlated with overall patient survival ($p < 0.05$). Furthermore, decreased miR-15a and miR-411 and increased miR-25, miR-205 and miR-196b expression was correlated with worse overall survival in both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma subtypes ($p < 0.05$).

miR-15a has been suggested to act as a tumor suppressor through inhibiting *BCL2*, which promotes cell survival (99) and plays a role in chemotherapy drug response (100, 101). Low miR-15a expression has been detected in lung tumors, mainly from patients with stage I and II disease (102); such studies confirmed the pro-apoptotic role of miR-15a through caspase 3/7 activation, reduction of cell viability and *BCL2* inhibition. Therefore, miR-15a may represent a potential therapeutic strategy to modulate apoptosis in NSCLC tumors over-expressing *BCL2* (103).

miR-25 over-expression was associated with tumor progression and prognosis in lung adenocarcinoma from female patients (104). Increased miR-25 expression was reported in radiotherapy-resistant tumors and was shown to modulate apoptosis induced by radiation (105). Interestingly, miR-25 has also been suggested to have a prognostic role in small cell lung cancer (106), a different type of lung cancer. These data, along with our results, suggest that miR-25 may be a prognostic biomarker in lung carcinoma.

Differential expression of miR-196b was reported in lung adenocarcinoma vs. squamous cell carcinoma (107) and this miRNA has been suggested to have prognostic value in gastric cancer and glioblastoma (108, 109). Among the molecular targets of miR-196, Annexin 1 expression was associated with increased invasion and worse prognosis of patients with lung adenocarcinoma (110), suggesting that miR-196 may play an oncogenic role in NSCLC. Conversely, miR-196 has been reported to suppress metastasis in breast cancer (111). miRNAs may have a dual role in cancer cells, acting as tumor suppressors or oncogenes, depending on the cell type or cellular context. Examples include the miR-17-92 cluster, a complex miRNA cluster that include miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a and miR-92-1 9 (112). Recently, Li et al. reported that miR-196 can regulate oncogene and tumor suppressor gene expression in a simultaneous or sequential fashion in a mixed leukemia cell lineage (MLL) (113), indicating that there is a complex mechanism of gene expression regulation by miRNAs.

Among other differentially expressed miRNAs in lung adenocarcinoma vs. squamous cell carcinoma, miR-205 has been identified by several studies (76, 107, 114-116) and suggested as a circulating biomarker with diagnostic value in NSCLC (117). Distinct from our results, MarKou *et al* did not show a significant correlation between miR-205 over-expression and NSCLC patient survival (118). Another study showed that miR-205 was correlated with lymph node metastasis likely having a tumor suppressive role in breast cancer (119, 120). Experimental evidence indicate that miR-205 acts in lung tumorigenesis through *PTEN* inactivation (121).

Ours and the literature data suggest that miR-15a, miR-25, miR-205, miR-196b and miR-411 may have a prognostic value in NSCLC. Additional validation data in large patient cohorts are needed in order to evaluate the performance of such miRNAs as prognostic biomarkers in NSCLC.

Our computational analyses showed that deregulated miRNAs modulate genes involved in signaling networks during tumor progression. More importantly, miR-93, miR-452, miR-29b, miR-20a, miR135b, miR-15a, miR-15b, miR-196b, miR-708 and miR-744 were significantly correlated with target genes involved in lung tumorigenesis pathways. Signal transduction pathways including RAS-RAF-MEK and PI3K-AKT-mTOR are directly related to cell growth and are considered drivers of lung cancer progression (3). TCGA data showed that signaling pathways activated by *EGFR* mutations are found in

11% of tumors, *KRAS* mutations in 32%, *PI3K* mutations in 4%, *HER2* in 3% and *PTEN* inactivation in 3% of lung adenocarcinomas (57). In SCC, TCGA data showed that signaling tumorigenesis pathways are often activated by mutations in *TP53* in ~81% of tumors, *PI3K* in 16%, *PTEN* in 15%, *EGFR* in 9%, *KRAS* in 3% and *HER2* in 4% of tumors (56).

Our results thus showed deregulated miRNAs and their target genes in NSCLC. Further, we have showed a potential prognostic value for miR-15a, miR-25, miR-205 and miR-196a. Our data contribute to the development of validation strategies focused on this 4-miRNA signature in larger patient cohorts. In addition, our data may be useful for the development of more precise treatment strategies for patients with lung carcinoma.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(1):5-29.
 2. Silva JAGd. Incidência de Câncer no Brasil 2014. In: saúde Md, editor. 2015.
 3. Howlader N, Noone AM, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012 Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2015 [cited 2015 12 dec]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/.
 4. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(8):992-1001.
 5. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(14):1194-210.
 6. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(10):778-90.
 7. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(27):10143-8.
 8. Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89(12):857-62.
-

9. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2007;2(4):327-43.
 10. Zudaire I, Lozano MD, Vazquez MF, Pajares MJ, Agorreta J, Pio R, et al. Molecular characterization of small peripheral lung tumors based on the analysis of fine needle aspirates. *Histology and histopathology*. 2008;23(1):33-40.
 11. Wistuba, II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(7):2604-10.
 12. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in chest medicine*. 2011;32(4):703-40.
 13. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-50.
 14. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba, II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *Jama*. 2014;311(19):1998-2006.
 15. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-25.
 16. Chang JT, Lee YM, Huang RS. The impact of the Cancer Genome Atlas on lung cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015;166(6):568-85.
-

17. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(3):143-59.
 18. Markou A, Sourvinou I, Vorkas PA, Yousef GM, Lianidou E. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung cancer*. 2013;81(3):388-96.
 19. Goswami RS, Waldron L, Machado J, Cervigne NK, Xu W, Reis PP, et al. Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC biotechnology*. 2010;10:47.
 20. Zhang WC, Liu J, Xu X, Wang G. The role of microRNAs in lung cancer progression. *Medical oncology*. 2013;30(3):675.
 21. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*. 2004;64(11):3753-6.
 22. Gilad S, Lithwick-Yanai G, Barshack I, Benjamin S, Krivitsky I, Edmonston TB, et al. Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012;14(5):510-7.
 23. Barille-Nion S, Bah N, Vequaud E, Juin P. Regulation of cancer cell survival by BCL2 family members upon prolonged mitotic arrest: opportunities for anticancer therapy. *Anticancer research*. 2012;32(10):4225-33.
-

24. Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, Faquin WC, Clark JR, Begum S, et al. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(5):1645-54.
 25. Bozok Cetintas V, Tetik Vardarli A, Duzgun Z, Tezcanli Kaymaz B, Acikgoz E, Aktug H, et al. miR-15a enhances the anticancer effects of cisplatin in the resistant non-small cell lung cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
 26. Tafsiri E, Darbouy M, Shadmehr MB, Zagryazhskaya A, Alizadeh J, Karimipour M. expression of miRNAs in non-small-cell lung carcinomas and their association with clinicopathological features. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(3):1603-12.
 27. Druz A, Chen YC, Guha R, Betenbaugh M, Martin SE, Shiloach J. Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines. *RNA biology*. 2013;10(2):287-300.
 28. Xu FX, Su YL, Zhang H, Kong JY, Yu H, Qian BY. Prognostic implications for high expression of MiR-25 in lung adenocarcinomas of female non-smokers. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(3):1197-203.
 29. He Z, Liu Y, Xiao B, Qian X. miR-25 modulates NSCLC cell radio-sensitivity through directly inhibiting BTG2 expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;457(3):235-41.
 30. Yang T, Chen T, Li Y, Gao L, Zhang S, Wang T, et al. Downregulation of miR-25 modulates non-small cell lung cancer cells by targeting CDC42. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(3):1903-11.
-

31. Hamamoto J, Soejima K, Yoda S, Naoki K, Nakayama S, Satomi R, et al. Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Molecular medicine reports*. 2013;8(2):456-62.
 32. Lim JY, Yoon SO, Seol SY, Hong SW, Kim JW, Choi SH, et al. Overexpression of miR-196b and HOXA10 characterize a poor-prognosis gastric cancer subtype. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(41):7078-88.
 33. Ma R, Yan W, Zhang G, Lv H, Liu Z, Fang F, et al. Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PloS one*. 2012;7(6):e38096.
 34. Liu YF, Zhang PF, Li MY, Li QQ, Chen ZC. Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 2011;28(5):413-25.
 35. Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M, et al. Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer research*. 2010;70(20):7894-904.
 36. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current genomics*. 2010;11(7):537-61.
 37. Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nature communications*. 2012;3:688.
 38. Patnaik S, Mallick R, Kannisto E, Sharma R, Bshara W, Yendamuri S, et al. MiR-205 and MiR-375 microRNA assays to distinguish squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung cancer biopsies. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(3):446-53.
-

39. Bishop JA, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(2):610-9.
 40. Solomides CC, Evans BJ, Navenot JM, Vadigepalli R, Peiper SC, Wang ZX. MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis. *Acta cytologica*. 2012;56(6):645-54.
 41. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(12):2030-7.
 42. Jiang M, Zhang P, Hu G, Xiao Z, Xu F, Zhong T, et al. Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;383(1-2):67-75.
 43. Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clinical chemistry*. 2008;54(10):1696-704.
 44. Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu CG, Palazzo JP, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *The Journal of pathology*. 2009;219(2):214-21.
 45. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell research*. 2009;19(4):439-48.
-

46. Lei L, Huang Y, Gong W. miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. *Oncology reports*. 2013;30(6):2897-902.
47. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(13):1367-80.
-