

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 29/10/2017.



**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
mTOR/FGFR3	<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>
NSCLC	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>
RISC	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

---

<b>1. Introdução</b> .....	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
<b>2. Justificativa</b> .....	31
<b>3. Objetivos</b> .....	33
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	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
<b>5. Resultados</b> .....	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
<b>6. Discussão.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>65</b>
<b>8. Apêndices.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Anexo.....</b>	<b>93</b>

---



# **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).

---

## **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/](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, Jatkoje 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<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> 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.
-