

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Trabalho de Conclusão de Curso

**BUSCA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO
DE CÂNCER DE PULMÃO UTILIZANDO FERRAMENTAS DE
BIOLOGIA DE SISTEMAS**

Rodrigo Teixeira de Abreu

Trabalho de conclusão de curso sob orientação do Prof. Dr José Luiz Rybarczyk Filho apresentado ao Instituto de Biociências para a obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Botucatu

2013

Agradecimentos

Quero agradecer a minha família, que me apoia em todos os momentos de minha vida.

A todos os meus amigos que estiveram presentes durante os quatro anos de graduação e que tornaram esse período de conhecimento inesquecível.

Aos meus amigos mais distantes, com quem preservo fortes laços de amizade apesar da falta da convivência pessoal.

Ao meu orientador Professor Doutor José Luiz Rybarczyk Filho, que além de amigo me mostrou os caminhos e o saber da ciência.

Resumo

A quimioterapia é uma das formas de tratamentos para o câncer, cujo processo é pela aplicação de medicamentos que alteram a síntese de DNA, interrompendo a divisão celular. No caso do câncer de pulmão, a dificuldade está no fato de que as células cancerígenas criam quimiorresistência após um determinado período de tempo. Se o indivíduo desenvolver o câncer de pulmão novamente, deverá ser aplicado outro quimioterápico no paciente, e assim por diante. Nos tratamentos atuais são utilizadas combinações de drogas para contornar o problema da quimiorresistência. Este trabalho utilizou a biologia de sistemas para encontrar novos alvos protéicos para auxiliar no desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento do câncer de pulmão. Foi construída uma rede baseada nos alvos protéicos já conhecidos. A rede foi expandida com o intuito de buscar quais são as proteínas que interagem com os alvos protéicos já conhecidos. Após a expansão, foram utilizadas análises de centralidades para evidenciar as proteínas mais importantes na rede, e correlacionamos com informação de expressão gênica para verificar se as proteínas mais importantes do ponto de vista topológico estão diferencialmente sub ou super expressas. A análise de centralidade junto a mostra dos dados de expressão gênica convergiu para um bom resultado, foi possível evidenciar algumas proteínas que podem ser utilizadas como novos alvos quimioterápicos.

Sumário

1. Introdução	2
2. Objetivo	4
3. Materiais e Métodos	5
3.1 Redes	5
3.2 String	6
3.3 DrugBank	8
3.4 Gene Expression Omnibus (GEO)	8
4. Resultados	9
4.1 Alvos Protéicos	9
4.2 Rede de Interação Protéica	9
4.3 Expressão Gênica	14
5. Conclusão	16
Referências bibliográficas	16

Lista de Figuras

4.1	Rede de interação protéica referente aos alvos quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de pulmão	11
4.2	Mapa de calor para as seis centralidades estudadas.	12
4.3	Mapa de Calor para integração rede e informação gênica: (A) tecido normal ex-fumante <i>versus</i> tecido normal de não fumante, (B) tecido normal fumante <i>versus</i> tecido normal de não fumante.	14
4.4	Mapa de Calor para integração rede e informação gênica: (A) tecido tumoral de não fumante <i>versus</i> tecido normal de não fumante, (B) tecido tumoral de ex-fumante <i>versus</i> tecido normal de não fumante, (C) tecido tumoral de fumante <i>versus</i> tecido normal de não fumante	15

Lista de Tabelas

4.1	Relação dos quimioterápicos com os alvos, enzimas e transportadores	10
4.2	Tabela das 20 proteínas com os maiores valores de centralidades	13

Capítulo 1

Introdução

A definição de “câncer” designa um conjunto altamente heterogêneo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo e que têm em comum o crescimento celular desordenado, a invasão de tecidos e a formação de metástases [1].

A progressão do câncer é um processo complexo envolvendo inúmeras variáveis tais como: escalas temporais e espaciais, um grande número de rotas metabólicas e diferentes tipos celulares [2]. Esta doença pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o acréscimo da idade. O câncer é um dos maiores responsáveis pelas mortes no mundo, sendo os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama os que mais matam [3].

O câncer pulmonar, até o início do século XX, foi uma doença que raramente ocorria na população, porém a ocorrência está crescendo durante os últimos anos. Ela está como a primordial causa de morte entre os homens da América do Norte e na Europa, enquanto que na América Latina, África e Ásia a mortalidade vem aumentando consideravelmente [4].

O termo “câncer de pulmão” é usado para os tumores malignos do epitélio respiratório que contribuem com mais de 90% destas malignidades. Este tumor é uma das doenças malignas que mais mata em âmbito mundial, e é uma das três mais incidentes perdendo para o câncer de próstata nos homens e no câncer de mama nas mulheres. Para o ano de 2009, foram estimados, nos Estados Unidos da América, 1.479.350 casos novos. Dentre estes casos, o câncer de pulmão contribui com 219.440 (14,5%) casos, com parcelas de 116.090 e 103.350 para homens e mulheres[4]. Durante as últimas três décadas, os avanços no tratamento

do câncer de pulmão de pequenas células foram modestos, e ocorreram principalmente na doença estagiada como limitada.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer pulmonar é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando aumento de 2% por ano na sua incidência mundial. Em 90% dos casos diagnosticados, este tumor está associado ao consumo de derivados de tabaco. No Brasil, foi responsável por 20.622 mortes em 2008. Altamente letal, a sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento [3].

No fim do século XX, o câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de morte evitáveis. Evidências na literatura mostram que pessoas que desenvolvem este tipo de câncer, apresentam risco aumentado para o aparecimento de outros cânceres de pulmão e que irmãos, irmãs e filhos de pessoas que tiveram câncer de pulmão apresentam risco levemente aumentado para o desenvolvimento desse câncer. Entretanto, é difícil estabelecer o quanto do risco decorre de fatores hereditários e o quanto é devido ao hábito de fumar[3].

A quimioterapia é uma das formas de tratamento e pode ser combinado com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito.

A poliquimioterapia é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica das drogas, diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada [5].

Tendo em vista a grande preocupação com esse tipo de enfermidade, inúmeras pesquisas são realizadas nesse segmento. O desenvolvimento do câncer está relacionado com inúmeras interações químicas entre moléculas e com as células neoplásicas, o que torna o estudo difícil já que os estudos das características dessas moléculas são realizados em ensaios isolados com a atividade de uma única droga.

Usando as ferramentas de biologia de sistemas poderíamos estudar proteínas alvos de quimioterápicos, e sugerir novos alvos para tratamentos para evitar que as células cancerígenas desenvolvam quimiorresistência.

Capítulo 2

Objetivo

O objetivo deste projeto é construir uma rede de interação protéica para o câncer de pulmão através dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento e eleger os prováveis candidatos a alvos via análise de centralidade. Prospectar dados de transcriptomas de câncer e correlacionar com a rede obtida, com o intuito de identificar novos alvos potenciais para o tratamento quimioterápico.

- Buscar na literatura os quimioterápicos para o tratamento de câncer e os seus respectivos alvos protéicos. A partir dos alvos será construída a rede de interação;
- Determinar os possíveis alvos quimioterápicos através de análise de centralidade;
- Buscar dados de expressão gênica para câncer em bancos de informações transcricionais.;
- Projetar a expressão gênica sobre as redes. (análise qualitativa);

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Redes

Podemos encontrar redes complexas nos mais diversos contextos, como por exemplo: redes sociais, biológicas, tecnológicas, informação, etc. Redes sociais são aquelas formadas por grupos de pessoas que estão ligadas via relações profissionais, familiares, amizade, sexual, ou outros tipos. As redes tecnológicas são aquelas criadas pelo o homem, como redes de esgoto, água, luz, estrada, aeroportos, etc. Redes de informação dizem respeito a mensagens como por exemplo, as redes de TV, internet, citações, e consistem de inúmeros tipos. E por fim temos os exemplos das redes biológicas, como cérebro que é formado por uma rede de neurônios muito conectados entre si, o sistema vascular que pode ser considerado como uma rede, ou o genoma. Existem alguns modelos matemáticos de redes que podem ser usados para modelar algumas redes reais [6, 7, 8]. Uma rede é constituída por nodos e arestas, no caso de redes protéicas, o nodo é a proteína e a aresta é a interação entre as proteínas. A rede será analisada através do programa **Cytoscape v.2.8.3** [9], a fim de verificar quais os pontos mais críticos à sua estabilidade. Os índices utilizados para esse tipo de análise são os seguintes:

- **Conectividade:** representada por k_i , determina com quantos nodos vizinhos funcionais cada elemento da rede se conecta;
- **Coefficiente de Clusterização:** determinado matematicamente pela fórmula $C(i) = \frac{2n_i}{k_i(k_i-1)}$, onde n_i é o número de conexões dos vizinhos de um dado nodo i entre eles mesmos, e k_i , sua conectividade;

- **Grau de Intermediação:** Medida muito similar ao estresse, informa o quanto um nodo específico está em relação aos demais nodos da rede. Auxilia na definição de módulos do sistema;
- **Grau de Proximidade:** É o nível de proximidade de um nódo relacionada ao outros nodos da rede.
- **Sobreposição Topológica:** reflete a interconectividade entre quaisquer dois nodos na rede e permite a determinação das classes funcionais dos elementos da rede. Esse tipo de análise pode ser complementado com dados de ontologia dos elementos, buscados em bancos de dados como o *Gene Ontology* [10];
- **Conectividade média dos vizinhos:** calculado pela média de conectividade dos vizinhos de um determinado nodo. Oferece informações a respeito da modularidade da região de centralidade desse nodo;

Esses índices fornecem informações relevantes sobre o funcionamento de uma rede e nos permitirão inferir os genes críticos à sua estabilidade e quais fármacos ou combinações de fármacos possuem maior possibilidade de desestruturar o sistema como um todo.

3.2 String

STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) é um banco de dados de interação protéica, sendo mantido pelo Laboratório Europeu de Biologia Molecular (European Laboratory for Molecular Biology - EMBL) desde 2000 [11]. Atualmente encontra-se na versão 9.05. A parte interessante deste banco de dados disponibilizado pelo EMBL é justamente o controle da qualidade e origem da informação. Assim, escolhendo um organismo, por exemplo, podemos formar uma rede de interação em que as proteínas são os nodos e as interações são listadas controladamente, escolhendo-se níveis de confiança que controlem falsos positivos e falsos negativos adequadamente. O STRING considera duas categorias de relações entre proteínas: interações físicas (diretas) e associativas (indiretas), que são dados provenientes de rotas metabólicas. Estas categorias são subdividas em

quatro tipos de informações: Contexto Genômico, Alta-Performance, Co-Expressão e Conhecimento Prévio. Estes, por sua vez, são subdivididos em sete métodos de obtenção dos dados: *Neighborhood*, *Gene Fusion*, *Co-Ocurrence*, *Coexpression*, *Experimentos*, *Database* e *Textmining*. Tais métodos estão explicados no que segue.

- **Neighborhood, Gene Fusion e Co-ocurrence:** todos os três tipos têm o objetivo de identificar pares de genes que parecem ter sofrido pressão seletiva em comum durante o processo de evolução e que hoje funcionam de maneira associada.
- **Coexpression:** aponta pares de genes que estão sendo co-expressos no mesmo organismo.
- **Experimentos:** é uma lista de interação proteína-proteína retirada de outros bancos de dados de interação protéica tais como: BIND, DIP, GRID, HPRD, IntAct, MINT, PID.
- **Databases:** é idêntico aos “Experimentos”, porém são retirados de banco de dados de rotas metabólicas, estes dados são avaliados por especialistas. Exemplos: Biocarta, BioCyc, GO, KEGG, Reactome.
- **Textmining:** fornece uma lista de grupos de associação protéica que é retirada dos resumos de artigos que estão armazenados no PUBMED. Se dois genes ou proteínas estão citados no resumo, mesmo que não possuam nenhum tipo de interação, é o suficiente para dizer que existe uma associação entre elas.

O STRING nos possibilita combinar todos os métodos para a composição de uma rede de interações proteína-proteína, pela escolha de um score, dado por:

$$S = 1 - \prod_{i=1}^7 (1 - S_i), \quad (3.1)$$

onde S é o score ponderado sobre os sete métodos de predição, mas pode-se escolher o conjunto de métodos a serem considerados, S_i é o score individual de cada um dos métodos escolhidos. Este cálculo é feito para cada par de interação.

As probabilidades (escores) individuais são calculados tomando como base o KEGG [12]. A razão disso é que no KEGG os dados são analisados (curados) manualmente, vários organismos são disponibilizados e diferentes áreas funcionais são consideradas. Mais ainda, o KEGG está em constante atualização sendo portanto, indicado como *padrão ouro* para verificação da existência ou não de uma associação protéica. Os escores fornecem informação sobre a probabilidade de, dado que o STRING encontre associação entre duas proteínas, elas interajam em uma mesma rota metabólica do KEGG.

3.3 DrugBank

O **DrugBank** (<http://www.drugbank.ca/>) [13] é um banco de dados disponibilizado pela Universidade de Alberta (Canadá), sendo o único recurso de bioinformática e quimioinformática que combina informações detalhadas de medicamentos químicos e farmacológicos com informações dos alvos (seqüência, estrutura química, via metabólica, etc.) de cada droga. O DrugBank contém atualmente o registro de 6827 drogas, dentre elas: drogas experimentais, nutracêuticos, drogas de moléculas pequenas e drogas biotecnológicas aprovadas pelo órgão governamental norte-americano de Administração de Alimentos e Medicamentos (Food and Drug Administration - FDA).

3.4 Gene Expression Omnibus (GEO)

Os microarranjos são empregados na detecção e quantificação dos níveis de expressão de ácidos nucléicos provenientes de amostras biológicas (expressão gênica), os quais são postas para hibridizar com o DNA fixado no arranjo. Estas amostras são o objeto de estudo do pesquisador, sejam elas preparadas a partir de células normais, cancerosas, tecido neuronal, etc. Os dados de expressão gênica serão resgatados do repositório público **GEO** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) [14], o qual possui uma enorme quantidade de experimentos com chips de cDNA sobre genes expressos em diferentes situações celulares. Atualmente existem cerca de 10262 experimentos para *Homo sapiens*.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Alvos Protéicos

Nos primeiros meses da pesquisa foram dedicados para a construção da rede de interação proteica, para isto foi necessária a busca de todos os alvos protéicos de todos os quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer. Esta busca foi realizada via a leitura de artigos. A maioria dos artigos focaliza a ação de um novo tratamento comparando-o com o utilizado habitualmente. Dentre as drogas encontradas as mais importantes são: cisplatina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbine [13]. Com esses nomes dos quimioterápicos para o tratamento do câncer de pulmão, foi feita uma tabela para uma análise posterior no DrugBank. A tabela 4.1 contém além dos nomes dos quimioterápicos, o mecanismo de ação, a interação da droga, os alvos, os transportadores e as enzimas.

4.2 Rede de Interação Protéica

Para construção da rede de interação protéica foram utilizados as proteínas alvos contidas na tabela 4.1. Ao todo foram inseridas 31 proteínas humanas no banco de dados STRING usando apenas os métodos de predição de interação “Databases” e ”Experimentos” com um escore de 0.9. Como resposta, o banco de dados retornou todas as proteínas que interagem com estas 31 proteínas previamente selecionadas. A figura 4.1 apresenta a rede obtida, ao todo temos 575 nodos e 13182 interações protéicas.

A análise de centralidade da rede foi conduzida utilizando o plugin Network Analyser

Droga	Alvos	Enzimas	Transportadores
FLAVOPIRIDOL	CDK2 CDK5 CDK9 CDC2 CDK6 EGFR CDK2deltaT CDK4 CDK8 CDK7 PYGM		ABCG2
VINORELBINA	TUBB	CYP3A4 CYP2D6	ABCB1
PEMETREXED	TYMS ATIC DHFR GART	DCK SLC29A1	
GEFITINIB	EGFR	CYP3A4 CYP2D6	ABCB1 ABCG2
LAPATINIB	EGRF ERBB2	CYP3A4 CYP3A5 CYP2C8 CYP2C19	ABCB1 TAP1
DOCETAXEL	TUBB1 BCL2	CYP3A4 CYP3A5 CYP3A7 CYP1B1	ABCB1 ABCC10
GEMCITABINA	RRM1 TYMS CMPK	CDA CDK	ABCB1 ABCC1 CLC29A1
ERLOTINIBE	EGFR NR1I2	CYP3A4 CYP1A2 CYP2D6 CYP1B1	CYP3A5 CYP1A1 ABCG2 ABCB1 CYP2C8
PLACLITAXEL	TUBB1 BCL2	CYP2C9 CYP3A7 CYP3A4 CYP1B1	CYP3A5 ABCB11 ABCB1 ABCC1 CYP2C8 ABCC10 CYP19A1
EPOTHILONE D	TUBA3C TUBB TUBB1 TUBB2C TUBB4 TUBA4A TUBB3 TUBA1C TUBA8 TUBB4Q TUBA1B TUBA1A		
EPOTHILONE B	TUBA3C TUBB TUBB1 TUBB2C TUBB4 TUBA4A TUBB3 TUBA1C TUBA8 TUBB4Q TUBA1B TUBA1A		
BEXAROTENE	RXRA RXRB RXRG	CYP3A4 CYP2C9	
CISPLATINA	DNA		ABCC3 ABCC5 ABCC2 SLC22A2 SLC31A1 SLC31A2 ABCC6 ABCB1 ATP7B ATP7A
ETOPOSIDE	TOP2A	CYP3A4 CYP2C8 CYP3A5	CYP1A2 CYP2E1 ABCC3 ABCC6 ABCC1 ABCC1 ABCC10 ABCC2 ABCG2
IRINOTECANO	TOP1 TOP1MT	CYP3A4 CES1 UGT1A1 UGT1A9	CYP3A5 CYP2B6 SLC22A3 ABCC1 ABCG2 SLCO1B1
TOPOTECANO	TOP1 TOP1MT DNA	CYP3A4	ABCG2 ABCB1
IFOSFAMIDAL	DNA	CYP2B6 CYP3A5 CYP2C9 CYP2A6 PTGS1 CYP3A7	CYP3A4 CYP2C19 CYP2C8 CYP2C18
IXABEPILONAL	TUBB3	CYP3A4	

Tab. 4.1: Relação dos quimioterápicos com os alvos, enzimas e transportadores

do software Cytoscape [9]. As centralidades foram utilizadas para medir a importância de um nodo na rede e se este nodo esta diretamente ligado com a sinalização celular. Foram

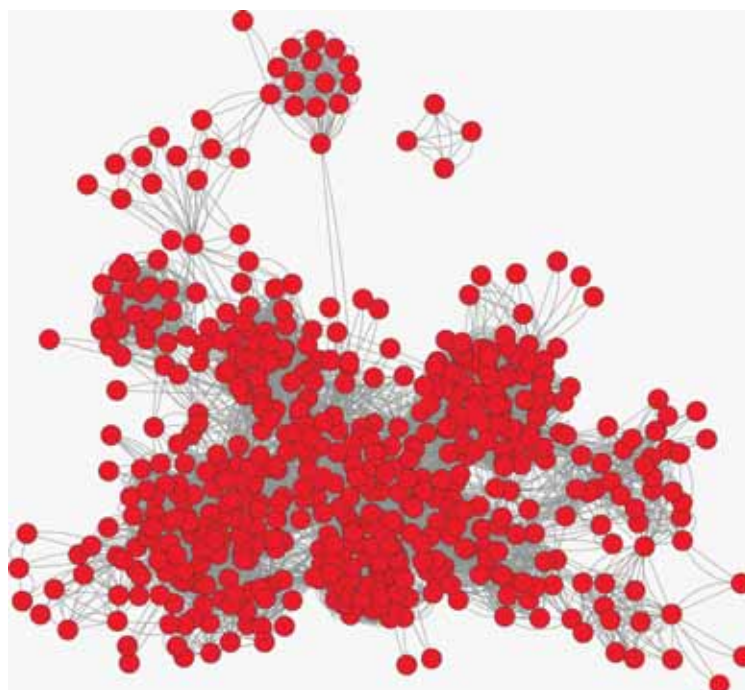


Fig. 4.1: *Rede de interação protéica referente aos alvos quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de pulmão*

utilizadas as seguintes centralidades: grau de proximidade, grau de intermediação, coeficiente de clusterização, sobreposição topológica, conectividade e conectividade média dos vizinhos. A figura 4.2 apresenta um mapa de calor - este mapa foi gerado com o uso do plugin Galant [15] - para cada uma das centralidades estudadas. As cores vermelho e azul significam respectivamente alta e baixa importância da centralidade para a rede. A tabela 4.2 apresenta as proteínas com os maiores valores de centralidades.

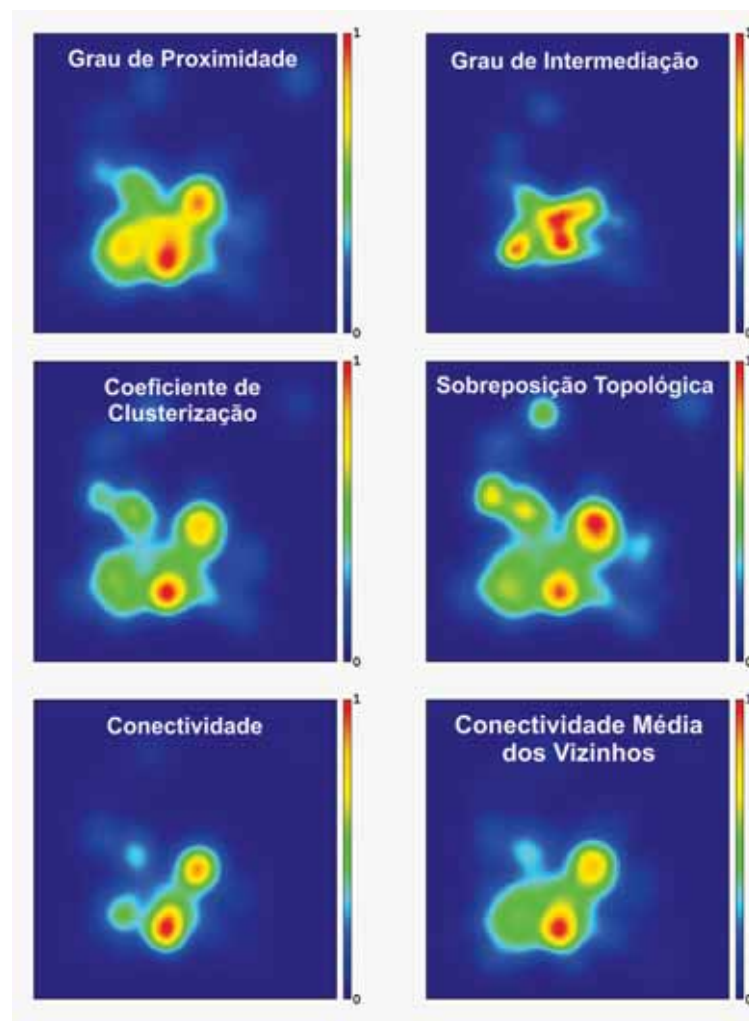


Fig. 4.2: Mapa de calor para as seis centralidades estudadas.

Tab. 4.2: Tabela das 20 proteínas com os maiores valores de centralidades

Gene	Grau de Intermediação	Grau de Proximidade	Coefficiente de Clustering	Conectividade	Conectividade Média dos Vizinhos	Sobreposição Topológica
TF53	0.15641375	0.47698745	0.29567901	81	42.38271605	0.09291748
EGFR	0.12285065	0.41666667	0.1057423	120	17.55	0.05822259
MYC	0.10789208	0.4415182	0.16653061	50	30.62	0.07861183
CDK2	0.06843583	0.42792793	0.26790451	117	39.32478632	0.12319481
ESR1	0.04767336	0.39473684	0.39686275	51	32.25490196	0.1123181
CCNH	0.04602645	0.41819516	0.37974684	80	44.12500	0.13290663
UBC	0.04280886	0.44117647	0.47574972	74	50.22972973	0.1307714
CTNNB1	0.04047058	0.40254237	0.17948718	39	32.41025641	0.10065297
RXRA	0.03903054	0.38076152	0.3169994	58	24.68965517	0.10439801
CCND1	0.03737759	0.4331307	0.34728984	79	45.59493671	0.12062153
CDKN1A	0.036715	0.42921687	0.31299673	93	44.60215054	0.13000408
CDK7	0.03516734	0.41304348	0.37154583	86	42.43023256	0.13687172
EGF	0.02778036	0.37328094	0.14811032	89	20.1011236	0.08375468
PCNA	0.02586515	0.38617886	0.32882883	37	32.7027027	0.12387387
POLR2A	0.02537623	0.38306452	0.43055556	81	39.25925926	0.17753198
MED1	0.02436927	0.34692635	0.63405797	24	25.29166667	0.16212607
AKT1	0.02370779	0.39229181	0.18262411	48	26.52083333	0.09356596
RAC1	0.02243637	0.38801906	0.27311522	38	26.97368421	0.10295299
HDAC1	0.02233026	0.39041096	0.31724138	30	28.73333333	0.10373045
UBA52	0.02163077	0.38513514	0.563495	74	50.21621622	0.18394218

4.3 Expressão Gênica

Os dados referente a câncer de pulmão foram retirados do banco de dados GEO. O conjunto analisado está armazenado no GEO sob o código GSE10072, esta amostra é composta de 107 microarranjos de tecido normal e tecido tumoral de homens e mulheres. As amostras foram divididas em fumantes (16 normais e 24 tumorais), ex-fumantes (18 normais e 17 tumorais), e não fumantes (15 normais e 16 tumorais). A figura 4.3 e figura 4.4 apresenta a integração da rede protéica e os dados de microarranjo dos tecidos tumorais e normais oriundos do pulmão. Ambas figuras apresentam um perfil de expressão muito similar, com a exceção da figura 4.4 (C) que apresenta um nível de expressão diferenciado das demais. Se compararmos a figura 4.2 e a figura 4.4 podemos notar que ambas áreas vermelhas são similares. Isso indica que as proteínas com altos valores de centralidades tem um papel fundamental no câncer de pulmão e que estes poderiam ser estudados com mais afinco no desenvolvimento de novas drogas.

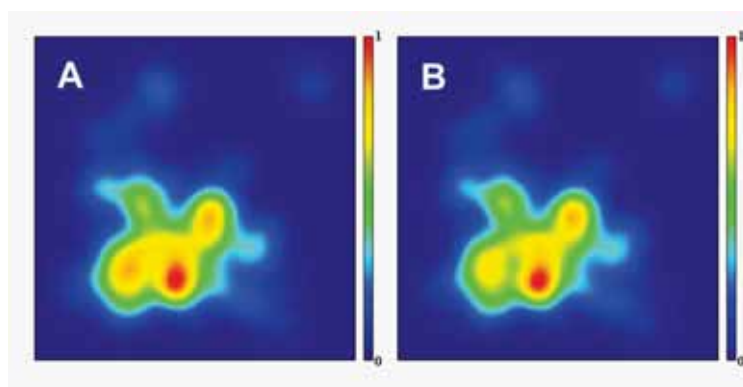


Fig. 4.3: Mapa de Calor para integração rede e informação gênica: (A) tecido normal ex-fumante versus tecido normal de não fumante, (B) tecido normal fumante versus tecido normal de não fumante.

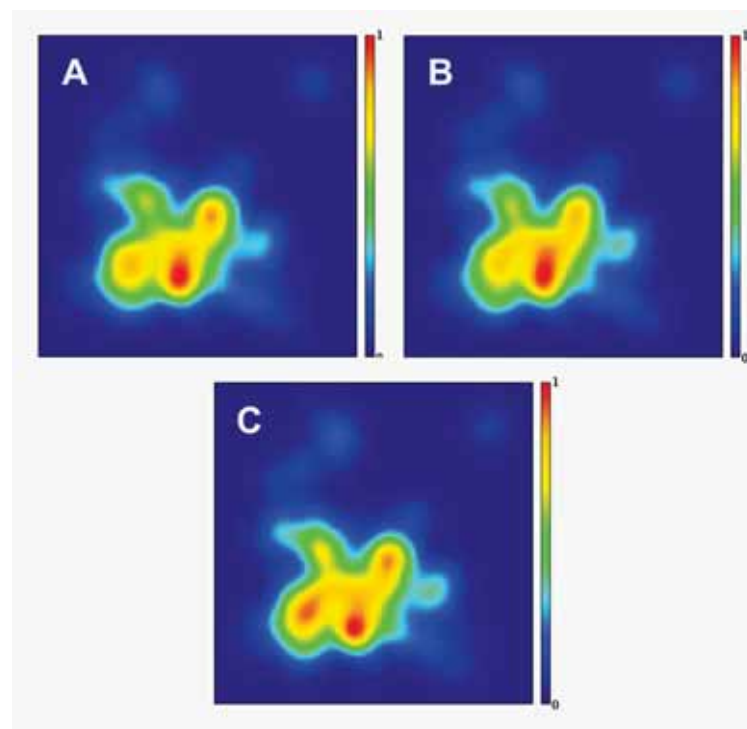


Fig. 4.4: Mapa de Calor para integração rede e informação gênica: (A) tecido tumoral de não fumante versus tecido normal de não fumante, (B) tecido tumoral de ex-fumante versus tecido normal de não fumante, (C) tecido tumoral de fumante versus tecido normal de não fumante

Capítulo 5

Conclusão

As análises mostra uma correlação da expressão gênica com a rede proteica com altos valores de centralidade. As proteínas selecionadas como possíveis alvos quimioterápicos mostram que o método foi capaz de indicar alvos já conhecidos, como o caso das proteínas EGPR e CDK's e observa-se que outras proteínas podem ser possíveis novos alvos quimioterápicos, como é o caso do TP53, MYC, CCNH e ESR1 que são proteínas importante relacionadas a outros tumores [16, 17, 18, 19].

Referências Bibliográficas

- [1] KUFELT D. W.; POLLOCK, R. E. W. R. B. R. C. G. T. S. H. J. F. . F. E. *Cancer Medicine*. [S.l.]: BC Decker, 2003.
- [2] ANDERSON, A. R.; QUARANTA, V. Integrative mathematical oncology. *Nature Reviews Cancer*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 3, p. 227–234, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrc/journal/vaop/ncurrent/full/nrc2329.html>>.
- [3] (INCA), I. N. de C. *Atlas de Mortalidade por Câncer*. setembro 2011. Disponível em: <<http://mortalidade.inca.gov.br>>.
- [4] ZAMBONI, M. Câncer do pulmão. *Revista da Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro*, v. 4, p. S1–S2, 2009.
- [5] ROSADO, J. O.; HENRIQUES, J. A.; BONATTO, D. A systems pharmacology analysis of major chemotherapy combination regimens used in gastric cancer treatment: predicting potential new protein targets and drugs. *Current cancer drug targets*, Bentham Science Publishers, v. 11, n. 7, p. 849–869, 2011. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/ccdt/2011/00000011/00000007/art00007>>.
- [6] RAVASZ, E. et al. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *science*, American Association for the Advancement of Science, v. 297, n. 5586, p. 1551–1555, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/297/5586/1551.short>>.
- [7] BARABASI, A.-L.; OLTVAI, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*, Nature Publishing Group, v. 5, n. 2, p. 101–113, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrg/journal/v5/n2/abs/nrg1272.html>>.

- [8] BOLLOBAS, B. *Random graphs*. [S.l.]: Cambridge university press, 2001.
- [9] SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, Cold Spring Harbor Lab, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/13/11/2498.short>>.
- [10] ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, Nature Publishing Group, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/ng/journal/v25/n1/abs/ng050025.html>>.
- [11] FRANCESCHINI, A. et al. String v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 41, n. D1, p. D808–D815, 2013. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/41/D1/D808.short>>.
- [12] KANEHISA, M. et al. The kegg databases at genomnet. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 30, n. 1, p. 42–46, 2002. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/30/1/42.short>>.
- [13] WISHART, D. S. et al. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 34, n. suppl 1, p. D668–D672, 2006. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/34/suppl1/D668.short>>.
- [14] BARRETT, T.; EDGAR, R. Gene expression omnibus: Microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods in enzymology*, Elsevier, v. 411, p. 352–369, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687906110198>>.
- [15] CAMILO, E. et al. Galant: a cytoscape plugin for visualizing data as functional landscapes projected onto biological networks. *Bioinformatics*, Oxford Univ Press, v. 29, n. 19, p. 2505–2506, 2013. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/29/19/2505.short>>.

- [16] COOPER, W. A. et al. Molecular biology of lung cancer. *Journal of thoracic disease*, Pioneer Bioscience Publishing Company, v. 5, n. Suppl 5, p. S479, 2013.
- [17] JI, Q. et al. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via malat1 mediated wnt/ β -catenin signal pathway. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 8, n. 11, p. e78700, 2013.
- [18] ZHANG, L. et al. Association between single nucleotide polymorphisms (snps) and toxicity of advanced non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *PloS one*, Public Library of Science, v. 7, n. 10, p. e48350, 2012.
- [19] ATMACA, A. et al. The validation of estrogen receptor 1 mrna expression as a predictor of outcome in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, Wiley Online Library, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28571/full>>.