

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 21/02/2018.



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

LIED PEREIRA MENDES

**Meta-análise para identificação de alterações
na expressão de microRNAs e vias moleculares
do desenvolvimento vascular reguladas por
microRNAs em Angiossarcoma**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bases Gerais da
Cirurgia da Faculdade de Medicina de
Botucatu UNESP, para obtenção do
título de Doutor.

**Orientador: Prof. Dr. Titular Winston Bonetti Yoshida
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis
Profa. Dra. Regina Moura**

Botucatu2017

Lied Pereira Mendes

Meta-análise para a identificação de alterações na expressão de microRNAs e vias moleculares do desenvolvimento vascular reguladas por microRNAs em Angiossarcoma.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof.Dr.Titular Winston Bonetti Yoshida

Co-orientadora: Profa.Dra. Patrícia Pintor dos Reis

Profa.Dra. Regina Moura

Botucatu

2017

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

Mendes, Lied Pereira.

Meta-análise para identificação de alterações na expressão de microRNAs e vias moleculares reguladas por microRNAs em angiossarcoma / Lied Pereira Mendes. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Winston Bonetti Yoshida

Coorientador: Patrícia Pintor Reis

Coorientador: Regina Moura

Capes: 40101045

1. MicroRNAs. 2. Carcinogênese. 3. Doenças vasculares.
4. Hemangiossarcoma. 5. Meta-análises.

Palavras-chave: Angiossarcoma; MicroRNAs; Tumor vascular; Tumorigênese; Vias moleculares.

“A única maneira de fazer um bom trabalho é amando o que você faz. Se você ainda não encontrou, continue procurando. Não se desespere. Assim como no amor, você saberá quando tiver encontrado.”

Steve Jobs

DEDICATÓRIA

*À Deus,
pelo dom da vida que é
a maior viagem de todas.*

*Aos meus pais,
que tanto se dedicaram
e me fizeram a mulher que sou hoje.*

*Ao meu marido,
pela paciência infinita
pelas palavras de incentivo nas horas de fraqueza
e pelo amor incondicional .*

*Aos meus filhos Pedro e Gabriel,
que trouxeram outro sentido a minha vida
e a tornaram mais completa.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida que neste processo se tornou meu amigo. Agradeço por sua paciência e dedicação em me ajudar, pela compreensão nos momentos difíceis e pela motivação. Obrigada por compartilhar todo esse período de trabalho aonde cresci profissionalmente e pessoalmente, formei uma família e pude compartilhar com a sua.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis que tornou possível este trabalho. Agradeço por dividir o seu conhecimento e me ajudar a abrir uma nova porta de aprendizado em minha vida. Sempre disposta e acessível, mesmo distante esteve presente me ajudando a tornar este sonho possível. A sua humildade e grandeza de espírito me inspiraram para a vida.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Regina Moura por ter acreditado em mim desde o início do nosso ambulatório e incentivado a formação deste grupo de estudo de Tumores Vasculares.

À todos do Laboratório Neogene que sempre estavam disponíveis para tirar minhas dúvidas e me ajudar a qualquer momento. Em especial para Natália Bertoni que mesmo com tanto trabalho no laboratório e em sua tese, sempre me respondia prontamente às minhas dúvidas.

À todos do Laboratório da Vascular que sempre me apoiaram em meu trabalho e incentivavam este estudo.

À equipe da Oncologia Pediátrica da UNESP, em especial Dra. Manuella Pacífico Segredo e a Dra. Débora Gasperini que me apoiaram e foram compreensivas neste momento tão importante da minha vida.

Aos secretários do Departamento de Pediatria Adriana, Fabiano e Paulo, pela ajuda com tudo que precisei. Vocês são muito importantes para nosso Departamento de Pediatria, tornando possível tantos trabalhos, ajudando com amor e dedicação. Obrigada por todo tempo dedicado a esse trabalho.

As pessoas envolvidas no programa de pós-graduação de Bases Gerais da Cirurgia que me acolheram com tanto carinho estimulando e orientando sempre que precisei. Obrigada pelo carinho e alegria com que sempre fui atendida, principalmente pela secretária Márcia que acompanhou todo o meu crescimento profissional e pessoal durante todo o processo.

Àqueles que, de alguma forma, direta ou indiretamente tenham contribuído para a elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Resumo	03
Introdução.....	04
Objetivos.....	09
Metodologia	10
1. Meta-análise de expressão gênica em Angiossarcoma	10
2. Extração dos dados	12
3. Metodologia de predição de genes regulados por miRNAs e integração de dados.....	12
4. Análise de Enriquecimento	13
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÕES E DIREÇÕES FUTURAS.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ABREVIATURAS.....	31

RESUMO:

INTRODUÇÃO: O Angiossarcoma (AS) é um tumor vascular maligno raro. As vias moleculares associadas ao desenvolvimento e progressão do AS ainda são pouco entendidas. miRNAs são moléculas reguladoras da expressão gênica com papel importante na tumorigênese e constituem biomarcadores em potencial, podendo definir prognóstico e tratamento de pacientes com câncer. A identificação de perfis de expressão de miRNAs e das vias moleculares reguladas por miRNAs pode contribuir para a elucidação dos mecanismos de tumorigênese em AS. **OBJETIVOS:** Identificação da expressão global de miRNAs e vias moleculares em AS. Identificar miRNAs alterados em AS; identificar genes-alvo regulados pelos miRNAs e mapear miRNAs e genes alvo relacionados ao desenvolvimento vascular. **MATERIAL E MÉTODOS:** Realizamos uma meta-análise segundo a Declaração de Prisma e utilizando as principais bases de dados, PubMed e EMBASE. Após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão específicos, um estudo (incluindo 5 amostras de AS) foi considerado elegível e selecionado para extração dos dados. Deste, foram identificados os miRNAs significativamente desregulados ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$). A seguir, os dados de expressão de miRNAs foram analisados utilizando as ferramentas de bioinformática miRWalk v.2.0 para predição de genes-alvo regulados pelos miRNAs e STRING e Cytoscape v.3.1.1/BINGO para identificação de redes de interação (miRNAs-mRNAs-alvo) e funções biológicas, respectivamente. **RESULTADOS:** 59 miRNAs estavam com expressão significativamente aumentada ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) em AS. Destes, 21 miRNAs interagem com 28 genes-alvo enriquecidos para funções associadas ao desenvolvimento vascular. Os genes-alvo identificados têm papel fundamental na tumorigênese, pois regulam o crescimento celular e estão envolvidos em mecanismos de invasão, metástase e resposta a quimioterápicos. **CONCLUSÕES:** Os miRNAs identificados, em particular miR-1323, miR-520h, miR-1283 e miR-144-5p regulam genes envolvidos em desenvolvimento vascular e mecanismos de tumorigênese. Estudos como este contribuem para o melhor entendimento do desenvolvimento e progressão do AS, bem como para a identificação de novos biomarcadores e tratamentos mais precisos, impactando a sobrevida dos pacientes.

ABSTRACT:

INTRODUCTION: Angiosarcoma (AS) is a rare malignant vascular tumor. The molecular pathways associated with AS development and progression are still poorly understood. MiRNAs are regulatory molecules of gene expression with important role in tumorigenesis and are potential biomarkers, which can define the prognosis and treatment of cancer patients. The identification of expression profiles of miRNAs and molecular pathways regulated by miRNAs may contribute to the elucidation of the mechanisms of tumorigenesis in AS. **OBJECTIVES:** Identificação da expressão global de miRNAs e vias moleculares em AS. Identificar miRNAs alterados em AS; identificar genes-alvo regulados pelos miRNAs e mapear miRNAs e genes alvo relacionados ao desenvolvimento vascular. **MATERIAL AND METHODS:** We performed a meta-analysis following the Prisma Statement and using the main databases PubMed and EMBASE. Following the application of specific inclusion and exclusion criteria, one study (including 5 AS samples) was eligible and selected for data extraction and analysis. Of this study, we identified significantly deregulated miRNAs ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$). Further, miRNA expression data was analyzed using the bioinformatic tools miRWalk v.2.0 for target gene prediction and STRING and Cytoscape v.3.1.1/BINGO for identification of miRNA-mRNA networks and biological functions, respectively. **RESULTS:** 59 miRNAs were significantly over-expressed ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) in AS. Of these, 21 miRNAs interact with 28 target genes with functions enriched for vascular development. Target genes identified have an important role in tumorigenesis, since they regulate cell growth and are involved in mechanisms of invasion, metastasis and chemotherapy response. **CONCLUSIONS:** miRNAs identified herein, in particular miR-1323, miR-520h, miR-1283 and miR-144-5p regulate genes involved in vascular development and tumorigenesis mechanisms. Studies such as this contribute to better understand the development and progression of AS, as well as to identify novel biomarkers and more precise treatment strategies, impacting patient survival.

PALAVRAS-CHAVE: Angiossarcoma, tumor vascular, microRNA, mRNA, vias moleculares, tumorigênese, tratamento, meta-análise.

KEY-WORDS: Angiossarcoma, vascular tumor, microRNA, mRNA, molecular pathways, tumorigenesis, treatment, meta-analysis.

INTRODUÇÃO

Os tumores vasculares podem ser classificados, segundo a *International Society for the Study of Vascular Anomalies* (ISSVA), em benignos, intermediários e malignos (Tabela1)¹. O Angiossarcoma (AS) é um tumor vascular maligno derivado de células endoteliais vasculares e linfáticas². Pode ser classificado como visceral e periférico e seu comportamento é agressivo independente do local acometido^{2, 3}. Pode acometer a cabeça e o pescoço (27%), mamas (19,7%), extremidades (15%), tronco (9,5%), fígado (6%), coração (4,7%), ossos (3,6%), baço (2,6%) e outros sítios (11,6%)². O AS periférico representa um raro subgrupo dos sarcomas de partes moles (menos de 2%) caracterizado por um comportamento agressivo^{3, 4}. Possui um prognóstico ruim, com sobrevida livre de doença em 5 anos de 35% nos casos não metastáticos e uma taxa de recidiva acima de 75% nos 2 primeiros anos após o tratamento^{5, 6}. Ocorre igualmente em ambos os sexos, podendo aparecer em qualquer faixa etária, sendo mais comum em idosos².

TABELA 1-2014 ISSVA - Classificação das Anomalias Vasculares

Tumores Vasculares Benignos	Hemangioma infantil Hemangioma congênito Hemangioma em tufo Hemangioma de células fusiformes Hemangioma epitelióide Granuloma piogênico Outros
Tumores Vasculares Intermediários ou de Agressividade Local	Hemangioendotelioma Kaposiforme Hemangioendotelioma Retiniforme Angioendotelioma papilar intralinfático Hemangioendotelioma composto Sarcoma de Kaposi Outros
Tumores Vasculares Malignos	Angiossarcoma Hemangioendotelioma epitelióide Outros

A maior parte dos casos de AS ocorre espontaneamente, porém há alguns relatos de lesões vasculares benignas com transformação maligna². Apesar de raro, lesões benignas como hemangiomas que mudam o comportamento clínico e aumentam repentinamente de tamanho devem ser investigadas devido à possibilidade

de transformação maligna⁷. O Linfedema crônico, seja de qualquer origem, está associado à maior incidência de AS². A Radioterapia também pode aumentar a frequência deste tumor, com pico de incidência de 5 a 10 anos após o tratamento². Há um aumento da incidência de transformação maligna de lesões vasculares benignas previamente irradiadas^{2, 7}.

O AS de partes moles se caracteriza por massas multinodulares, hemorrágicas com áreas císticas e necrose⁸. Este tumor pode apresentar vários padrões morfológicos, indo desde áreas de vasos bem formados a áreas aonde não se consegue definir um padrão vascular⁸. Possui áreas sólidas compostas de células epitelióides e fusiformes de alto grau, com citoplasma levemente eosinofílico, núcleos grandes e nucléolos proeminentes^{8, 9}. São neoplasias de alto grau, com atividade mitótica intensa, necrose e atipia nuclear significativa, normalmente apresentando extensas áreas hemorrágicas⁸.

Estudos de análise imunohistoquímica em AS mostraram que essa neoplasia normalmente expressa marcadores endoteliais como: CD34, CD31, Fli1, fator VIII, Ulex europaeus agglutinin 1, ERG e ocasionalmente a podoplanina (D2-40) um marcador linfático^{2, 8-10}. Os tumores também podem apresentar positividade para vimentina, actina e mioglobulina⁹.

Devido ao AS constituir um tumor de origem endotelial, há um grande interesse no papel dos fatores de angiogênese na sua patogênese e como podem ser usados como marcadores e terapias-alvo². Os principais promotores da angiogênese são: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF)¹¹. O VEGF e seus subtipos podem estar com expressão aumentada no AS^{2, 12}. Alterações na expressão do *TP53* foram relatadas, assim como superexpressão do *WT1* e Galectina-3^{2, 13, 14}. Comparando com outros sarcomas, o AS apresenta

expressão aumentada de receptores vasculares específicos incluindo *TIE1*, *KDR*, *TEK* e *FLT1*⁸. Alterações dos genes *MYC* e *FLT4* são fortemente relacionadas ao AS^{4, 8}. Os mecanismos de tumorigênese do AS ainda não estão completamente elucidados. Portanto, a realização de estudos moleculares que contribuam para o entendimento de tais mecanismos moleculares em AS são justificados, visto que podem levar ao desenvolvimento de terapêuticas mais precisas e efetivas nesta doença¹⁵.

Os miRNAs são RNAs pequenos (19-24 nucleotídeos) não codificadores de proteínas e que regulam uma proporção significativa dos genes. Os miRNAs regulam genes que participam de um grande número de processos biológicos e são fundamentais no controle da homeostase celular, desenvolvimento, diferenciação, reprogramação celular, oncogênese, entre outros¹⁶.

De acordo com pesquisa recente (data de acesso em 02 de Dezembro de 2016) na base de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>), 2.588 sequências de miRNAs maduros foram identificadas e anotadas no genoma humano. Alterações na expressão do miRNAs induzem fenótipos alterados, tais como o que ocorre doenças cardiovasculares e o câncer. O entendimento dos mecanismos de expressão e desregulação dos miRNAs e os genes regulados por miRNAs contribuirá para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento de doenças complexas¹⁶⁻¹⁸. Nos últimos anos, evidenciou-se que a desregulação dos miRNAs está fortemente ligada a processos celulares associados a doenças crônico-degenerativas e ao câncer^{19, 20}.

Uma aplicação clínica importante da identificação de perfis de expressão de miRNAs constitui a potencial utilização desses perfis como biomarcadores com valor diagnóstico, prognóstico e preditivo no câncer e em outras doenças^{21, 22}.

Considerando que os miRNAs existem de forma estável em flúidos corporais como soro e plasma, muitos estudos têm explorado sua aplicação como biomarcadores circulantes, em várias condições fisiológicas e patológicas²³⁻²⁸.

Estudos recentes mostraram que células tumorais liberam, na circulação sanguínea, uma quantidade aumentada de microvesículas, as quais podem conter miRNAs, com papéis importantes na sinalização celular e na tumorigênese^{29, 30}.

No endotélio vascular, miRNAs endoteliais estão presentes e controlam a resposta endotelial a estímulos angiogênicos, indicando o seu papel como moduladores da resposta angiogênica³¹. Em particular, o miR-126 foi descrito como regulador positivo da sinalização angiogênica e da integridade endotelial vascular. Alterações na expressão do miR-126 foram associadas a defeitos no desenvolvimento vascular, onde células deficientes em miR-126 não responderam a fatores angiogênicos como VEGF e bFGF³¹. Outros miRNAs, como o miR-221 e o miR-222, atuam como inibidores do fator estimulador de células-tronco associado ao processo de angiogênese. Alguns miRNAs desempenham um papel pró-angiogênico como foi demonstrado na inibição da expressão dos miRNAs miR-27b e o miR-let-7f reduzindo a angiogênese³¹.

Igualmente, a hipóxia, um fenômeno associado à tumorigênese, pode levar à ativação da atividade angiogênica modulada por miRNAs. Recentemente, foi demonstrado que a atividade pró-angiogênica do miR-210 é estimulada por eventos de hipóxia celular ou tecidual³¹.

A expressão aumentada de miRNAs pró-angiogênicos em células endoteliais pode alterar a produção de fatores angiogênicos, contribuindo com o processo de tumorigênese. Por outro lado, alguns miRNAs quando inibidos, como os miRNAs miR-

126 e miR-296, levam à redução da vascularização tumoral, apresentando ação antitumoral³¹.

O entendimento de mecanismos genéticos e epigenéticos, como alterações em miRNA e expressão de genes alvo, assim como as vias moleculares reguladas pelos miRNAs, podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento de pacientes com AS³².

São raros os estudos de meta-análise para o melhor entendimento da expressão global de miRNAs em AS. Uma pesquisa recente no PubMed (22 de Setembro de 2016), revelou poucos estudos sobre a expressão de miRNAs em AS. Entre estes, um estudo mostrou que o miR-222-3p estava com expressão aumentada e os miRNAs, miR-378-3p, miR-483-5p e miR-497-5p estavam com expressão diminuída em AS (n=5 AS e 5 hemangiomas capilar humano)¹⁵. Esse mesmo estudo demonstrou que o miR-497-5p regula positivamente os canais de cálcio da membrana celular (KCa3.1), atuando como inibidor do crescimento tumoral¹⁵. Outro estudo mostrou o papel do miR-17-92 como regulador positivo na amplificação do *MYC*, responsável pelo fenótipo angiogênico do AS e como regulador negativo do gene *THBS1*, um potente inibidor endógeno da angiogênese.

Em estudo prévio do nosso grupo, uma meta-análise de dados de expressão gênica em hemangioma identificou genes comumente alterados, bem como miRNAs como potenciais reguladores da expressão gênica, associados aos hemangiomas. Os dados gerados nesse estudo contribuíram para um melhor entendimento das vias moleculares desreguladas e potencialmente associadas ao desenvolvimento e progressão do hemangioma. Adicionalmente, esses dados são úteis para o delineamento de estudos de validação, objetivando o desenvolvimento de terapêuticas mais precisas com alvos moleculares.

CONCLUSÕES E DIREÇÕES FUTURAS

Identificamos a expressão significativamente aumentada ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,05$) de 59 miRNAs, sendo 21 relacionados ao desenvolvimento vascular. Esses 21 miRNAs potencialmente regulam 28 genes associados ao processo de desenvolvimento vascular e a mecanismos importantes no crescimento tumoral, invasão e metástase. Também atuam na resposta a vários quimioterápicos como: Gencitabina, Carboplatina e Transtuzumabe. Apresenta comportamento diferenciado dependendo do tipo histológico, podendo influenciar o prognóstico em diferentes tipos de tumor. É um caminho promissor para novas terapias alvo, entretanto estudos adicionais são necessários para entender melhor seus mecanismos no AS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wassef M, Blei F, Adams D, et al. Vascular Anomalies Classification: Recommendations From the International Society for the Study of Vascular Anomalies. *Pediatrics* 2015;136:e203-14.
2. Young RJ, Brown NJ, Reed MW, et al. Angiosarcoma. *Lancet Oncol* 2010;11:983-91.
3. Buehler D, Rice SR, Moody JS, et al. Angiosarcoma outcomes and prognostic factors: a 25-year single institution experience. *Am J Clin Oncol* 2014;37:473-9.
4. Italiano A, Thomas R, Breen M, et al. The miR-17-92 cluster and its target THBS1 are differentially expressed in angiosarcomas dependent on MYC amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:569-78.
5. Ji G, Hong L, Yang P. Successful treatment of angiosarcoma of the scalp with apatinib: a case report. *Onco Targets Ther* 2016;9:4989-92.
6. Mark RJ, Poen JC, Tran LM, et al. Angiosarcoma. A report of 67 patients and a review of the literature. *Cancer* 1996;77:2400-6.
7. Nathenson MJ, Molavi D, Aboulafia A. Angiosarcoma arising in a patient with a 10-year-old hemangioma. *Case Rep Oncol Med* 2014;2014:185323.
8. Antonescu C. Malignant vascular tumors--an update. *Mod Pathol* 2014;27 Suppl 1:S30-8.
9. Costache M, Ene AM, Simionescu O, et al. Histopathological diagnosis of cutaneous vascular sarcomas. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:105-9.
10. Al-Abbadi MA, Almasri NM, Al-Quran S, et al. Cytokeratin and epithelial membrane antigen expression in angiosarcomas: an immunohistochemical study of 33 cases. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:288-92.
11. Tille JC, Pepper MS. Hereditary vascular anomalies: new insights into their pathogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1578-90.
12. Itakura E, Yamamoto H, Oda Y, et al. Detection and characterization of vascular endothelial growth factors and their receptors in a series of angiosarcomas. *J Surg Oncol* 2008;97:74-81.
13. Zietz C, Rossle M, Haas C, et al. MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up-regulation in angiosarcomas. *Am J Pathol* 1998;153:1425-33.
14. Timar J, Meszaros L, Orosz Z, et al. WT1 expression in angiogenic tumours of the skin. *Histopathology* 2005;47:67-73.
15. Chen Y, Kuang D, Zhao X, et al. miR-497-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting KCa3.1 in angiosarcoma. *Oncotarget* 2016.
16. Boyd SD. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest* 2008;88:569-78.
17. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
18. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522-31.
19. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857-66.
20. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-69.
21. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006.
22. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513-8.
23. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3:e3148.
24. Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010;70:9798-807.
25. Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009;58:1375-81.

26. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009;112:55-9.
27. Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4402-7.
28. Zhang C, Wang C, Chen X, et al. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem* 2010;56:1871-9.
29. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:543-50.
30. Heishima K, Mori T, Ichikawa Y, et al. MicroRNA-214 and MicroRNA-126 Are Potential Biomarkers for Malignant Endothelial Proliferative Diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:25377-91.
31. Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. *Sci Signal* 2009;2:pe1.
32. Bertoni N, Pereira LM, Severino FE, et al. Integrative meta-analysis identifies microRNA-regulated networks in infantile hemangioma. *BMC Med Genet* 2016;17:4.
33. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ* 2009;339:b2535.
34. Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 2015;4:1.
35. Sarver AL, Phalak R, Thayanithy V, et al. S-MED: sarcoma microRNA expression database. *Lab Invest* 2010;90:753-61.
36. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, et al. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One* 2011;6:e17429.
37. Snel B, Lehmann G, Bork P, et al. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res* 2000;28:3442-4.
38. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D808-15.
39. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13:2498-504.
40. Saito R, Smoot ME, Ono K, et al. A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods* 2012;9:1069-76.
41. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 2005;21:3448-9.
42. Nguyen PN, Huang CJ, Sugii S, et al. Selective activation of miRNAs of the primate-specific chromosome 19 miRNA cluster (C19MC) in cancer and stem cells and possible contribution to regulation of apoptosis. *J Biomed Sci* 2017;24:20.
43. Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, et al. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 2004;428:529-35.
44. Zong FY, Fu X, Wei WJ, et al. The RNA-binding protein QKI suppresses cancer-associated aberrant splicing. *PLoS Genet* 2014;10:e1004289.
45. Lu W, Feng F, Xu J, et al. QKI impairs self-renewal and tumorigenicity of oral cancer cells via repression of SOX2. *Cancer Biol Ther* 2014;15:1174-84.
46. Shingu T, Ho AL, Yuan L, et al. Qki deficiency maintains stemness of glioma stem cells in suboptimal environment by downregulating endolysosomal degradation. *Nat Genet* 2017;49:75-86.
47. Xiao L, Wang J, Li J, et al. RORalpha inhibits adipocyte-conditioned medium-induced colorectal cancer cell proliferation and migration and chick embryo chorioallantoic membrane angiopoiesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;308:C385-96.
48. Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R, et al. RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response. *Oncogene* 2006;25:2901-8.

49. Du J, Xu R. RORalpha, a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13:15755-66.
50. Zhou X, Huang D, Xue Z, et al. Effect of HIF-1alpha on biological activation of human tongue squamous cell carcinoma SCC-15 cells in vitro. *Int J Oncol* 2015;46:2346-54.
51. Chen T, Ren Z, Ye LC, et al. Factor inhibiting HIF1alpha (FIH-1) functions as a tumor suppressor in human colorectal cancer by repressing HIF1alpha pathway. *Cancer Biol Ther* 2015;16:244-52.
52. Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, et al. Paired related homoeobox 1, a new EMT inducer, is involved in metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109:307-11.
53. Sugiyama M, Hasegawa H, Ito S, et al. Paired related homeobox 1 is associated with the invasive properties of glioblastoma cells. *Oncol Rep* 2015;33:1123-30.
54. Chen P, Rossi N, Priddy S, et al. EphB2 activation is required for ependymoma development as well as inhibits differentiation and promotes proliferation of the transformed cell. *Sci Rep* 2015;5:9248.
55. Sikkema AH, den Dunnen WF, Hulleman E, et al. EphB2 activity plays a pivotal role in pediatric medulloblastoma cell adhesion and invasion. *Neuro Oncol* 2012;14:1125-35.
56. Noberini R, Pasquale EB. Proliferation and tumor suppression: not mutually exclusive for Eph receptors. *Cancer Cell* 2009;16:452-4.
57. Goparaju C, Donington JS, Hsu T, et al. Overexpression of EPH receptor B2 in malignant mesothelioma correlates with oncogenic behavior. *J Thorac Oncol* 2013;8:1203-11.
58. Myung DS, Park YL, Kim N, et al. Expression of early growth response-1 in colorectal cancer and its relation to tumor cell proliferation and apoptosis. *Oncol Rep* 2014;31:788-94.
59. Egerod FL, Bartels A, Fristrup N, et al. High frequency of tumor cells with nuclear Egr-1 protein expression in human bladder cancer is associated with disease progression. *BMC Cancer* 2009;9:385.
60. Wang XQ, Tang ZX, Yu D, et al. Epithelial but not stromal expression of collagen alpha-1(III) is a diagnostic and prognostic indicator of colorectal carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:8823-38.
61. Januchowski R, Swierczewska M, Sterzynska K, et al. Increased Expression of Several Collagen Genes is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. *J Cancer* 2016;7:1295-310.
62. Colbert LE, Petrova AV, Fisher SB, et al. CHD7 expression predicts survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer. *Cancer Res* 2014;74:2677-87.
63. Ou D, Yang H, Hua D, et al. Novel roles of TMEM100: inhibition metastasis and proliferation of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:17379-90.
64. Eisenman ST, Gibbons SJ, Singh RD, et al. Distribution of TMEM100 in the mouse and human gastrointestinal tract--a novel marker of enteric nerves. *Neuroscience* 2013;240:117-28.
65. Han Y, Jia C, Cong X, et al. Increased Expression of TGFbetaR2 Is Associated with the Clinical Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Chemotherapy. *PLoS One* 2015;10:e0134682.
66. Lei J, Rudolph A, Moysich KB, et al. Assessment of variation in immunosuppressive pathway genes reveals TGFBR2 to be associated with prognosis of estrogen receptor-negative breast cancer after chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2015;17:18.
67. Yu X, Li Y, Chen SW, et al. Differential expression of glypican-3 (GPC3) in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma and its clinical significance. *Genet Mol Res* 2015;14:10185-92.
68. Xiong XL, Qin H, Yan SQ, et al. Expression of glypican-3 is highly associated with pediatric hepatoblastoma: a systemic analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:1029-31.
69. Hakim SA, Raboh NM. Immunohistochemical expression of glypican 3 in endometrial carcinoma and correlation with prognostic parameters. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:13225-32.
70. Wu XY, Xu H, Wu ZF, et al. Formononetin, a novel FGFR2 inhibitor, potently inhibits angiogenesis and tumor growth in preclinical models. *Oncotarget* 2015;6:44563-78.

71. Kim DH, Kwak Y, Kim ND, et al. Antitumor effects and molecular mechanisms of ponatinib on endometrial cancer cells harboring activating FGFR2 mutations. *Cancer Biol Ther* 2016;17:65-78.
72. Li HG, Liu FF, Zhu HQ, et al. PIK3CA polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:15255-9.
73. Black JD, Lopez S, Cocco E, et al. PIK3CA oncogenic mutations represent a major mechanism of resistance to trastuzumab in HER2/neu overexpressing uterine serous carcinomas. *Br J Cancer* 2015;113:1641.
74. Weng TY, Wang CY, Hung YH, et al. Differential Expression Pattern of THBS1 and THBS2 in Lung Cancer: Clinical Outcome and a Systematic-Analysis of Microarray Databases. *PLoS One* 2016;11:e0161007.
75. Huang C, Zhou X, Li Z, et al. Downregulation of thrombospondin-1 by DNA hypermethylation is associated with tumor progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2016;14:2489-96.
76. Wang Z, Zhang H, Hou J, et al. Clinical implications of beta-catenin protein expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:14989-94.
77. Barghout SH, Zepeda N, Xu Z, et al. Elevated beta-catenin activity contributes to carboplatin resistance in A2780cp ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;468:173-8.
78. Ye T, Ip JP, Fu AK, et al. Cdk5-mediated phosphorylation of RapGEF2 controls neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Commun* 2014;5:4826.
79. Magliozzi R, Low TY, Weijts BG, et al. Control of epithelial cell migration and invasion by the IKKbeta- and CK1alpha-mediated degradation of RAPGEF2. *Dev Cell* 2013;27:574-85.
80. Otomo R, Otsubo C, Matsushima-Hibiya Y, et al. TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:18691-6.
81. Wang HX, Li Q, Sharma C, et al. Tetraspanin protein contributions to cancer. *Biochem Soc Trans* 2011;39:547-52.
82. Cho YW, Hong T, Hong S, et al. PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J Biol Chem* 2007;282:20395-406.
83. Pavlov N, Frendo JL, Guibourdenche J, et al. Angiogenin expression during early human placental development; association with blood vessel formation. *Biomed Res Int* 2014;2014:781632.
84. Vasiljevic N, Ahmad AS, Carter PD, et al. DNA methylation of PITX2 predicts poor survival in men with prostate cancer. *Biomark Med* 2014;8:1143-50.
85. Wan Abdul Rahman WF, Fauzi MH, Jaafar H. Expression of DNA methylation marker of paired-like homeodomain transcription factor 2 and growth receptors in invasive ductal carcinoma of the breast. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:8441-5.
86. Zhang JX, Tong ZT, Yang L, et al. PITX2: a promising predictive biomarker of patients' prognosis and chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2013;132:2567-77.
87. Pichiorri F, Palmieri D, De Luca L, et al. In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. *J Exp Med* 2013;210:951-68.
88. Berger CM, Gaume X, Bouvet P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* 2015;113:78-85.
89. Qian B, Yao Y, Liu Y, et al. Nucleolin identified by comparative massspectra analysis is a potential marker for invasive progression of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2014;10:1489-94.
90. Tyner JW, Rutenberg-Schoenberg ML, Erickson H, et al. Functional characterization of an activating TEK mutation in acute myeloid leukemia: a cellular context-dependent activating mutation. *Leukemia* 2009;23:1345-8.
91. Ye C, Pan L, Huang Y, et al. Somatic mutations in exon 17 of the TEK gene in vascular tumors and vascular malformations. *J Vasc Surg* 2011;54:1760-8.

92. Hawkins SM, Loomans HA, Wan YW, et al. Expression and functional pathway analysis of nuclear receptor NR2F2 in ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1152-62.
93. Bartholomeusz C, Xie X, Pitner MK, et al. MEK Inhibitor Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) Prevents Lung Metastasis in a Triple-Negative Breast Cancer Xenograft Model. *Mol Cancer Ther* 2015;14:2773-81.
94. Arcila ME, Drilon A, Sylvester BE, et al. MAP2K1 (MEK1) Mutations Define a Distinct Subset of Lung Adenocarcinoma Associated with Smoking. *Clin Cancer Res* 2015;21:1935-43.
95. Penzvalto Z, Lanczky A, Lenart J, et al. MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2014;14:837.
96. Renault MA, Roncalli J, Tongers J, et al. The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. *Circ Res* 2009;105:818-26.
97. Ishikawa M, Sonobe M, Imamura N, et al. Expression of the GLI family genes is associated with tumor progression in advanced lung adenocarcinoma. *World J Surg Oncol* 2014;12:253.
98. Nagao H, Setoguchi T, Kitamoto S, et al. RBPJ is a novel target for rhabdomyosarcoma therapy. *PLoS One* 2012;7:e39268.
99. Xue L, Li H, Chen Q, et al. Inhibition of Recombining Binding Protein Suppressor of Hairless (RBPJ) Impairs the Growth of Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:1982-90.
100. Thibaudeau L, Taubenberger AV, Theodoropoulos C, et al. New mechanistic insights of integrin beta1 in breast cancer bone colonization. *Oncotarget* 2015;6:332-44.
101. Huang QB, Ma X, Li HZ, et al. Endothelial Delta-like 4 (DLL4) promotes renal cell carcinoma hematogenous metastasis. *Oncotarget* 2014;5:3066-75.
102. Zhang YZ, Qin F, Han ZG, et al. Prognostic significance of DLL4 expression in papillary thyroid cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:2901-5.