

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 28/01/2021.



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

Ana Laura Seneda

**Perfil de Expressão de microRNAs e Análise
Computacional de Vias Moleculares Moduladas
por microRNAs em Tumor Carcinoide de Pulmão**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestra em Bases Gerais da
Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis

**Botucatu
2019**

Ana Laura Seneda

Perfil de Expressão de microRNAs e Análise
Computacional de Vias Moleculares
Moduladas por microRNAs em Tumor
Carcinoide de Pulmão

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra
em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Seneda, Ana Laura.

Perfil de expressão de microRNAs e análise
computacional de vias moleculares moduladas por microRNAs
em tumorcarcinoide de pulmão / Ana Laura Seneda. -
Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Capes: 20000006

1. Pulmões - Câncer. 2. MicroRNAs. 3. Sistema
imunológico.

Palavras-chave: Invasão; MicroRNAs; Sistema imune; Tumor
carcinoide de pulmão; Vias neuronais.

Dedicatória

A **Deus**, por me permitir chegar até aqui e concluir essa etapa.

À **minha família**, em especial aos meus pais, **Mariza da Silva Seneda** e

Carlos Alberto Seneda, e irmãs, **Letícia Fernanda Seneda** e **Maria Júlia Seneda**, por todo o carinho, apoio, incentivo e compreensão, e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos **pacientes** que cederam suas amostras para a pesquisa, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis**, pelas orientações, pelo conhecimento, pela paciência, pela atenção, pelo tempo disposto e incentivo.

Aos professores membros da banca, **Dra. Sandra Aparecida Drigo** e **Dr. Tiago da Silva Medina**, pela presença e valiosas sugestões.

À **Tainara Francini Felix** pela disponibilidade de me ensinar as técnicas utilizadas.

À **equipe do Laboratório NeoGene**, Carolina Campos, Iael Weissberg, Márcio de Carvalho, Marco Lapa, Natália Bertoni e Tatiane Basso, pelo apoio, ajuda e momentos de descontração nesses dois anos.

A **André Luiz Ventura Sávio**, por todo carinho e apoio incondicional e por sempre acreditar em mim.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**
pela bolsa concedida.

Aos **colaboradores do projeto**, Dr. Antonio Cataneo, Dr. Cristiano Oliveira,
Dra. Daniele Cataneo, Dra. Érica Hasimoto, Dr. Julio De Faveri, Dr. Luis
Mur, Dr. Rogério de Oliveira.

À **Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP)** e à **Unidade de
Pesquisa Experimental (UNIPEX)** pela estrutura disponibilizada e a todos
seus **funcionários**.

A todos os **funcionários** da Biblioteca e da Seção Técnica de Pós-
Graduação, em especial à secretária do Programa de Bases Gerais da
Cirurgia, **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, por toda ajuda e apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse
trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

“Devemos acreditar que temos vocação para alguma coisa, e que essa coisa deve, a qualquer custo, ser alcançada.”

Marie Curie

Resumo

Introdução: O tumor carcinoide do pulmão pertence ao tipo neuroendócrino das neoplasias pulmonares. Devido à sua baixa incidência (~2%), pouco se conhece sobre suas alterações moleculares. Os microRNAs (miRNAs) têm importante papel na regulação gênica e têm sido associados ao câncer como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos. **Objetivos:** Determinar o perfil global de expressão de miRNAs em tumores carcinoides do pulmão e identificar (*in silico*) vias moleculares envolvendo os miRNAs desregulados e genes-alvo preditos. **Material e Métodos:** Dois fragmentos de um tumor carcinoide típico e sua metástase correspondente foram obtidos, o RNA extraído de cada amostra e analisado na plataforma *TaqMan Low Density Array* (TLDA), a qual contém sondas para 384 miRNAs. Os dados foram analisados no *Expression Suite software*. Adicionalmente, 7 tumores (5 carcinoides típicos e 2 atípicos) foram utilizados para análise de expressão de 2,578 miRNAs na plataforma GeneChip™ miRNA 4.0 e os dados analisados utilizando o *Transcriptome Analysis Console software*. A análise estatística dos dados foi realizada para identificação dos miRNAs significativamente ($p < 0,05$) alterados. Métodos de análise *in silico* incluíram a identificação de mRNAs-alvo dos miRNAs e vias moleculares de tumorigênese. **Resultados e Discussão:** No tumor carcinoide típico e metástase (TLDA), 15 miRNAs estavam com expressão comumente diminuída, os quais regulam genes associados a vias de resposta imune adaptativa. Adicionalmente, a comparação dos carcinoides típicos ou atípicos vs. normal (GeneChip arrays) resultou na identificação de 9 miRNAs desregulados em tumores típicos e 21 miRNAs em atípicos ($p < 0,01$ and $FDR < 0,05$). Em tumores típicos, os miRNAs modulam genes-alvo envolvidos na regulação do receptor *FCER1*, *PDGF* e *NGF* via *TRKA*. Nos tumores atípicos, os miRNAs alterados regulam genes associados à resposta imune inata e adaptativa e mecanismos de desenvolvimento e diferenciação neuronal. **Conclusões:** (1) a expressão diminuída de um conjunto específico de 15 miRNAs deve modular mecanismos de resposta imune e invasão associados ao desenvolvimento e progressão de um caso raro de carcinoide típico metastático; (2) os carcinoides típicos e atípicos apresentam diferentes perfis de expressão de miRNAs e vias moleculares de tumorigênese. Esses dados contribuem para o melhor entendimento de alterações em miRNAs e vias moleculares associadas aos tumores carcinoides de pulmão.

Palavras-chave: tumor carcinoide de pulmão, microRNAs, sistema imune, invasão, vias neuronais.

Abstract

Introduction: Lung carcinoid tumors are a type of neuroendocrine lung neoplasia. Due to its low incidence (~2%), little is known about the molecular alterations associated with these tumors. microRNAs (miRNAs) have an important role in gene regulation and have been associated with cancer as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. **Objectives:** To determine the global expression miRNA profiles of lung carcinoid tumors and to identify (*in silico*) molecular pathways including deregulated miRNAs and predicted target-genes. **Material and Methods:** Two fragments of a typical carcinoid tumor and its corresponding metastasis were obtained, the RNA extracted and analyzed using the TaqMan Low Density Array (TLDA) platform containing 384 miRNAs. Data were analyzed using *Expression Suite* software. Additionally, 7 tumors (5 typical and 2 atypical carcinoids) were used for expression analysis of 2,578 miRNAs in the GeneChip™ miRNA 4.0 platform and data were analyzed using the Transcriptome Analysis Console software. Statistical analysis was performed to identify the significantly ($p < 0.05$) deregulated miRNAs. *In silico* analyses methods included the identification of miRNA target genes (and enriched pathways. **Results and Discussion:** In the typical carcinoid tumor and metastasis (TLDA data), 15 miRNAs were commonly down-regulated and these modulate genes associated with the adaptive immune system pathway. Additionally, the comparison of typical carcinoids or atypical vs. normal (GeneChip arrays) showed 9 deregulated miRNAs in typical tumors and 21 miRNAs in atypical ($p < 0.01$ and $FDR < 0.05$). In typical tumors, identified miRNAs modulate the expression of target genes involved in the regulation of receptor *FCER1*, *PDGF* e *NGF* via *TRKA*. In the atypical tumors, altered miRNAs regulate genes with roles in adaptive and immune response and neuronal development and differentiation. **Conclusions:** (1) the 15 down-regulated miRNA subset may modulate mechanisms of immune response and invasion, associated with the development and progression in a rare case of metastatic carcinoid typical tumor; (2) typical and atypical lung carcinoids have different miRNA expression profiles and tumorigenesis pathways. These data contribute to our better understanding of miRNA alterations and pathways associated to lung carcinoid tumors.

Key-words: lung carcinoid tumor, microRNAs, immune system, invasion, neuronal pathways.

Lista de abreviaturas e siglas

3'UTR – Região 3' não-traduzida; 3' untranslated region

AC – Carcinóide Atípico; Atypical Carcinoid **AJCC** – American Joint Committee on Cancer

AKT – AKT serine/threonine kinase

ALK – ALK receptor tyrosine kinase

BAX – BCL2 associated X, apoptosis regulator

BCL2 – BCL2, apoptosis regulator

BTLA – B and T lymphocyte associated

CD200 – CD200 molecule

CD200R – CD200 receptor

CD28 – CD28 molecule

CDC42 – Cell Division Cycle 42

CDK – Cyclin Dependent Kinase (2 and 6) **CDKN1B** –

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B **CTLA-4** –

Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4 **E2F1** –

E2F Transcription Factor 1

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

ERK – MAPK1 Mitogen-activated Protein Kinase 1

FC – Fold Change

FCεRI – Fc epsilon fragment of IgE receptor I

FDR – False Discovery Rate

FFPE – Tecido fixado, embebido em formalina; Formalin-fixed, paraffin-embedded

GEO – Gene Expression Omnibus

H&E – Hematoxilina e Eosina; Hematoxin and Eosin

HMGA2 – High Mobility Group AT-hook 2

IASLC – Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão; International Association for the Study of Lung Cancer

IgE – Immunoglobulin E

IKBKB – Inhibitor of Nuclear Factor kappa B Kinase Subunit

Beta **MAPK** – Mitogen-activated Protein Kinase 1

MHC II – Major Histocompatibility Complex, class II

MIEN1 – Migration and Invasion Enhancer 1 **mirDIP**

– microRNA Data Integration Portal **miRNA** –

microRNA

MMP9 – Matrix Metalloproteinase 9

mRNA – RNA mensageiro; Messenger RNA

NF-κB – Nuclear Factor kappa B

NGF – Nerve Growth Factor

NSCLC – Câncer de pulmão de células não pequenas; Non-small cell lung cancer

p27 – p27 protein

PD-1 – Programmed Cell Death 1

PDGF – Platelet Derived Growth Factor (A, B, C and

D) **PDGFR** – Platelet Derived Growth Factor Receptor

PI3K – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PTEN – Phosphatase and Tensin Homolog

QC – Controle de Qualidade; Quality Control **RAP2B**

– RAP2B, Member of RAS Oncogene Family **RAS** –

RAS Proto-oncogene, GTPase

RNA – Ácido Ribonucleico; Ribonucleic Acid

SCGN – Secretagogin, EF-hand Calcium Binding Protein

SEER – Surveillance, Epidemiology and End Results Program

SOCS1 – Suppressor of Cytokine Signaling 1

STAT3 – Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TC – Carcinoide Típico; Typical Carcinoid

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TLDA – TaqMan Low Density Array

TNF – Tumor Necrosis Factor

TNM – Tumor, Nódulo, Metástase; Tumor, Nodule, Metastasis

TRAF6 – TNF Receptor Associated Factor 6

TRK – Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase (A, B and C)

VEGFA – Vascular Endothelial Growth Factor A

Lista de símbolos

$\sim$ aproximadamente

$<$ menor que

$>$ maior que

$\geq$ maior ou igual que

$^{\text{TM}}$ – Marca Registrada; Trade Mark

ε – epsilon

κ – kappa

Sumário

1 Introdução.....	15
2 Justificativa.....	19
3 Objetivos	19
Referências Bibliográficas	20
Capítulo 1.....	24
microRNA Downregulation is Associated with Pathways of Adaptive Immune Response and Invasion in Metastatic Typical Lung Carcinoid Tumors	25
Introduction	27
Material and Methods.....	27
Results	28
Discussion/Conclusion	30
References	33
Figures.....	36
Tables	41
Capítulo 2.....	44
microRNA expression profiles and prognostic value in typical and atypical lung carcinoid tumors.....	45
Introduction	47
Material and Methods.....	48
Results	50
Discussion of Main Findings.....	52
References	57
Figure	62
Tables	63

1 Introdução

De acordo com dados do GLOBOCAN (2018), o câncer de pulmão é o mais incidente e o maior em número de mortes em todo o mundo. O câncer de pulmão de células não pequenas representa a maioria dos casos (~85%), enquanto que o de células pequenas representa ~15%. O câncer de pulmão é mais comumente diagnosticado em pacientes com idade igual ou maior a 65 anos, sendo que o consumo excessivo de tabaco é um dos principais fatores de risco (1).

Os tumores neuroendócrinos compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias que se originam de células neuroendócrinas, acometendo mais comumente os pulmões, intestino liso e reto (2). Os tumores neuroendócrinos pulmonares que ocorrem como células individuais ou pequenos clusters, também denominados de corpos neuroepiteliais (3), compreendem aproximadamente 25% das neoplasias pulmonares primárias (4).

Os tumores neuroendócrinos pulmonares compreendem quatro subtipos: (a) carcinoide típico bem diferenciado de baixo grau (2% das neoplasias pulmonares); (b) carcinoide atípico bem diferenciado de grau intermediário (<1%), (c) carcinoma de grandes células pobremente diferenciado de alto grau (3%) e (d) carcinoma de células pequenas pobremente diferenciado de alto grau (20%) (4,5).

Os subtipos carcinoide típico e atípico de tumores neuroendócrinos do pulmão são o foco da nossa pesquisa.

Ao contrário dos outros tipos de câncer de pulmão, os tumores neuroendócrinos são mais comuns em pacientes jovens e não estão na sua maioria associados ao tabagismo (5). Mesmo sendo considerados tumores menos frequentes, sua incidência vem aumentando nos últimos anos (6). Entretanto, ainda há um baixo reconhecimento desses tumores pelos especialistas os quais estão diretamente envolvidos no diagnóstico e tratamento dos pacientes. Este é um fator importante a ser considerado, visto que o diagnóstico corretamente aplicado e realizado precocemente está associado à implementação de estratégias de tratamento adequadas e tem impacto prognóstico (7).

Aproximadamente 2/3 dos tumores carcinoides se desenvolvem nos brônquios principais. Dessa forma, os sintomas clínicos mais comuns associados com o desenvolvimento desses tumores incluem dor torácica, dispnéia, tosse, a qual pode ou não ser acompanhada de sangue e pneumonia obstrutiva (8).

O diagnóstico é feito com base nas características histopatológicas dos tumores, contagem do número mitoses, presença ou ausência de necrose e positividade para

marcadores de imunohistoquímica específicos para células neuroendócrinas, como sinaptofisina e cromogranina A (9,10).

Quanto às características histopatológicas desses tumores, os carcinoides típicos são de baixo grau e os atípicos são de grau intermediário. Embora esses tumores possam ser diagnosticados em análises citológicas a partir de lavado brônquico ou por meio de biópsia, é difícil distinguir histologicamente os tumores típicos dos atípicos. O diagnóstico preciso geralmente requer análise histológica de um fragmento tumoral retirado por meio de biópsia ou cirurgia. A morfologia dos tumores carcinoides típicos e atípicos é similar com uma população uniforme de células tumorais organizadas em nichos organoides com uma quantidade moderada de citoplasma com tonalidade eosinofílica. Existe uma variedade de padrões histológicos predominantes desses tumores, incluindo células fusiformes, padrão oncocítico, glandular, folicular, células claras e melanocítico. Os carcinoides típicos apresentam menos de 2 mitoses por 2 mm² e ausência de necrose, enquanto os atípicos mostram um número aumentado de mitoses (2-10 mitoses por 2 mm²) e necrose, sendo que a presença de um grande número de figuras mitóticas é a característica mais importante para distinção dos subtipos típico e atípico (4,9,10).

Entretanto, a classificação e diagnóstico dos tumores carcinoides típicos e atípicos ainda são complexas, devido a fatores etiológicos não bem estabelecidos e sintomas inespecíficos da doença (7).

Os carcinoides atípicos têm maior probabilidade de recorrência ou aparecimento de metástases quando comparados com os tumores típicos, nos quais os pacientes têm melhor prognóstico (11,12). Dos tumores carcinoides, 10-30% são atípicos (8).

O estadiamento dos tumores carcinoides pulmonares primários é realizado de acordo com a classificação TNM (Tumor, Nódulo, Metástase). A Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão (IASLC) aprovou essa classificação em 2009 quando foi determinado que o sistema de estadiamento TNM era útil para prever o prognóstico de pacientes com tumores carcinoides (13). A aplicação desse sistema de estadiamento a casos registrados no Instituto Nacional do Câncer (*Surveillance, Epidemiology and End Results Program* – banco de dados SEER) determinou que a sobrevida de 5 anos dos pacientes com doença de estadiamento I é de 93%, estadiamento II de 74%, estadiamento III de 67-75% e estadiamento IV de 57% (13). Vários estudos indicam que a maioria dos pacientes com carcinoides típicos apresentam estadiamento I de doença (até 90% dos casos) enquanto os pacientes com carcinoides atípicos apresentam doença em estadiamento avançado (8).

A sobrevida é significativamente melhor para os pacientes com tumores típicos comparado com atípicos. Para pacientes com carcinoides típicos, a sobrevida de 5 e 10 anos é estimada em 87% e 86%, respectivamente e para aqueles com carcinoides atípicos, de 56% e 35%, respectivamente (14). Os fatores preditivos de sobrevida incluem o estadiamento, tamanho do tumor, presença de altos índices mitóticos (no subtipo atípico) e idade superior a 60 anos (11,13).

A cirurgia é a modalidade de tratamento primário e até o momento constitui a única opção curativa para pacientes com tumores carcinoides típicos e atípicos. Devido à localização central dos tumores, na maioria dos casos, a pneumonectomia ou bilobectomia é frequente, entretanto a maioria dos pacientes é submetida à lobectomia (15). Há um consenso na literatura que recomenda a dissecação completa de linfonodos no mediastino e, quando possível, a ressecção de linfonodos metastáticos (12), sendo associada à diminuição de recorrência local e melhoria da sobrevida (16). Entretanto, alguns autores consideram que há falta de consenso entre os protocolos de tratamento e manejo adequados de pacientes com tumores pulmonares neuroendócrinos, principalmente no contexto de doença não ressecável cirurgicamente e ou metastática, devido à falta de evidência clínica (7).

A terapia adjuvante para o tratamento dos tumores carcinoides ainda é questionável, principalmente devido à falta de dados. Outro fator importante é que, normalmente, eles apresentam resistência tanto à quimio- quanto à radioterapia. Ainda assim, a terapia adjuvante é indicada em casos de ressecção incompleta dos tumores ou quando há envolvimento de linfonodos do mediastino e das margens teciduais (17).

Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar novas terapias. Yao *et al* mostraram que a terapia com everolimus foi capaz de reduzir o risco de progressão da doença (18). Outro estudo, utilizando linhagens celulares de tumores carcinoides, mostrou que a combinação de octreotida, cabergolina e inibidores de mTOR foi capaz de reduzir a viabilidade celular e a fosforilação de Akt e ERK (19).

A maioria dos estudos sobre as bases moleculares do câncer de pulmão tem sido realizada em carcinomas de células não pequenas e levaram à identificação principalmente de mutações em genes condutores da tumorigênese (20). Muitos dos genes identificados levaram ao desenvolvimento de terapias mais precisas para os pacientes diagnosticados com o subtipo adenocarcinoma pulmonar, tais como os inibidores tirosina-quinase para mutações no receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (21).

Embora as características histopatológicas dos tumores carcinoides estejam bem descritas, a literatura é escassa em relação às alterações moleculares (8,22–30). Alguns estudos ainda mostram que essas alterações não são as mesmas encontradas em outros tipos de câncer de pulmão (26,28,31). Da mesma forma, os dados sobre microRNAs (miRNAs) em tumores carcinoides também são escassos (32–38).

A literatura evidencia que é necessária a realização de estudos sobre os mecanismos moleculares associados aos tumores carcinoides. Tais estudos devem levar à elucidação das vias moleculares implicadas no desenvolvimento e progressão neoplásica. Adicionalmente, podem contribuir para a identificação de biomarcadores para melhorar o valor diagnóstico, prognóstico ou tratamento dos pacientes.

Os miRNAs têm sido amplamente associados com processos de desenvolvimento e progressão de inúmeros tipos de câncer. Os miRNAs são RNAs pequenos, de ~18 a 22 nucleotídeos de comprimento, não codificam proteínas e são potentes reguladores da expressão gênica. O mecanismo de ação dos miRNAs é principalmente pela ligação à extremidades 3' não traduzida (3' UTR) do RNA mensageiro (mRNA), geralmente levando à inibição da tradução ou à degradação do mRNA (39).

Os miRNAs estão envolvidos em muitos processos biológicos importantes, tais como o desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose e proliferação celular (40–42) e em mecanismos de oncogênese (43–45). Os miRNAs têm sido indicados como candidatos ideais a biomarcadores diagnósticos, prognósticos e como alvos terapêuticos potenciais no câncer (46–51).

2 Justificativa

O presente estudo faz-se necessário devido à escassez de dados sobre alterações genéticas e epigenéticas associadas ao desenvolvimento e progressão de tumores carcinoides do pulmão. Considerando que a identificação de vias moleculares condutoras da tumorigênese é de fundamental importância para determinar terapêuticas mais precisas para pacientes com câncer, a realização dessa pesquisa é plenamente justificada.

3 Objetivos

Objetivo 1. Determinar o perfil global de expressão de miRNAs em tumores carcinoides do pulmão;

Objetivo 2. Identificar (*in silico*) os mRNAs-alvo regulados pelos miRNAs e vias moleculares potencialmente condutoras da tumorigênese em tumores carcinoides do pulmão.

O presente trabalho de Dissertação de Mestrado está dividido em dois Capítulos, os quais compreendem os artigos científicos:

Capítulo 1: microRNA downregulation is associated with pathways of adaptive immune response and invasion in a rare metastatic typical lung carcinoid.

Capítulo 2: microRNA expression profiles and prognostic value in typical and atypical lung carcinoid tumors

Referências Bibliográficas

1. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. *Cancers (Basel)*. 2018;10(8):1–81.
2. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One Hundred Years After “Carcinoid”: Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):3063–72.
3. Filosso, Pier Luigi Asamura H, Brunelli A, Filosso PL, Garcia-Yuste M, Lim E, Papagiannopoulos K, Sarkaria I TP. Knowledge of Pulmonary Neuroendocrine Tumors: Where Are We Now? *Thorac Surg Clin*. 2014;24(3):ix–xii.
4. Rekhtman N. Neuroendocrine Tumors of the Lung: An update. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(11):1628–38.
5. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2015;10(9):1243–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
6. Sackstein PE, Neil DSO, Neugut AI, Chabot J, Fojo T, Irving H, et al. Epidemiologic trends in neuroendocrine tumors: An examination of incidence rates and survival of specific patient subgroups over the past 20 years. *Semin Oncol [Internet]*. 2018;45:249–58. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.07.001>
7. Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2017;12(3):425–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.2222>
8. Fink G, Krelbaum T, Yellin A, Bendayan D, Saute M, Glazer M, et al. Pulmonary carcinoid: Presentation, diagnosis, and outcome in 142 cases in Israel and review of 640 cases from the literature. *Chest*. 2001;119(6):1647–51.
9. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: New insights. *Transl Lung Cancer Res [Internet]*. 2017;6(5):513–29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.21037%2Ftlcr.2017.09.04>
10. Righi L, Gatti G, Volante M, Papotti M. Lung neuroendocrine tumors: Pathological characteristics. *J Thorac Dis*. 2017;9(Suppl 15):S1442–7.
11. Asamura H, Kameya T, Matsuno Y, Noguchi M, Tada H, Ishikawa Y, et al. Neuroendocrine Neoplasms of the Lung: A Prognostic Spectrum. *J Clin Oncol [Internet]*. 2006;24(1):70–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382115>
12. Thomas CF, Tazelaar HD, Jett JR. Typical and atypical pulmonary carcinoids: Outcome in patients presenting with regional lymph node involvement. *Chest [Internet]*. 2001;119(4):1143–50. Available from: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?doi=10.1378/chest.119.4.1143>
13. Travis WD, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the inclusion of broncho-pulmonary carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2008;3(11):1213–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e31818b06e3>
14. Tumors C, Granberg DAN, Wilander E, Kjell O, Skogseid B. Prognostic Markers in Patients with Typical Bronchial. 2000;85(9):0–5.
15. Pusceddu S, Lo Russo G, Macerelli M, Proto C, Vitali M, Signorelli D, et al. Diagnosis and management of typical and atypical lung carcinoids. *Crit Rev Oncol Hematol*

- [Internet]. 2016;100:167–76. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.009>
16. Filosso PL, Guerrera F, Thomas P, Brunelli A, Lim E, Garcia-yuste M, et al. Management of bronchial carcinoids : international practice survey among the European Society of Thoracic Surgeons. *Futur Oncol*. 2016;12(17):1985–99.
 17. Marquez-Medina D, Popat S. Systemic therapy for pulmonary carcinoids. *Lung Cancer* [Internet]. 2015;90(2):139–47. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.08.018>
 18. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, et al. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): A randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2016;387(10022):968–77.
 19. Pivonello C, Rousaki P, Negri M, Sarnataro M, Napolitano M, Zito F, et al. Effects of the single and combined treatment with dopamine agonist , somatostatin analog and mTOR inhibitors in a human lung carcinoid cell line : an in vitro study. *Endocrine*. :0–1.
 20. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA*. 2014;311(19):1998–2006.
 21. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: Relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):992–1001.
 22. Asiedu MK, Thomas CF, Dong J, Schulte SC, Khadka P, Sun Z, et al. Pathways impacted by genomic alterations in pulmonary carcinoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2018;24(7):1691–704.
 23. Simbolo M, Mafficini A, Sikora KO, Fassan M, Barbi S, Corbo V, et al. Lung neuroendocrine tumours: deep sequencing of the four World Health Organization histotypes reveals chromatin-remodelling genes as major players and a prognostic role for TERT, RB1, MEN1 and KMT2D. *J Pathol*. 2017;241(4):488–500.
 24. Lou G, Yu X, Song Z. Molecular Profiling and Survival of Completely Resected Primary Pulmonary Neuroendocrine Carcinoma. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2017;18(3):e197–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2016.11.014>
 25. Voortman J, Lee JH, Killian JK, Suuriniemi M, Wang Y, Lucchi M, et al. Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(29):13040–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919980/pdf/pnas.201008132.pdf>
 26. Armengol G, Sarhadi VK, Rönty M, Tikkanen M, Knuuttila A, Knuuttila S. Driver Gene Mutations of Non-Small-Cell Lung Cancer are Rare in Primary Carcinoids of the Lung: NGS Study by Ion Torrent. *Lung* [Internet]. 2015;193(2):303–8. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1007%2Fs00408-015-9690-1>
 27. Gómez JMN, Bernal JFV, Arranz PG, Fernández SL, Roman JJG. Alterations in the expression of p53, KLF4, and p21 in neuroendocrine lung tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(7):936–42.
 28. Fernandez-cuesta L, Peifer M, Lu X, Sun R, Ozretić L, Seidal D, et al. Frequent mutations in chromatin-remodeling genes in pulmonary carcinoids. *Nat Commun* [Internet]. 2014;3518(5):1–17. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1038%2Fncomms4518>
 29. Asiedu MK, Thomas CF, Tomaszek SC, Peikert T, Sanyal B, Sutor SL, et al. Generation and sequencing of pulmonary carcinoid tumor cell lines. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2014;9(12):1763–71. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000339>
30. Swarts DRA, Claessen SMH, Jonkers YMH, Van Suylen RJ, Dingemans AMC, De Herder WW, et al. Deletions of 11q22.3-q25 are associated with atypical lung carcinoids and poor clinical outcome. *Am J Pathol* [Internet]. 2011;179(3):1129–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.028>
 31. Rossi G, Bertero L, Marchiò C, Papotti M. Molecular alterations of neuroendocrine tumours of the lung. *Histopathology* [Internet]. 2018;72(1):142–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.13394>
 32. Di Fazio P, Maass M, Roth S, Meyer C, Grups J, Rexin P, et al. Expression of hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, and hsa-miR-222-3p and their putative targets HMGA2 and CDKN1B in typical and atypical carcinoid tumors of the lung. *Tumor Biol*. 2017;39(10):1–8.
 33. Yoshimoto T, Motoi N, Yamamoto N, Nagano H, Ushijima M, Matsuura M, et al. Pulmonary Carcinoids and Low-Grade Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors Show Common MicroRNA Expression Profiles, Different from Adenocarcinomas and Small Cell Carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2017;106(1):47–57.
 34. Demes M, Aszyk C, Bartsch H, Schirren J, Fisseler-Eckhoff A. Differential miRNA-Expression as an adjunctive diagnostic tool in neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel)*. 2016;8(4):1–9.
 35. Rapa I, Votta A, Felice B, Righi L, Giorcelli J, Scarpa A, et al. Identification of MicroRNAs Differentially Expressed in Lung Carcinoid Subtypes and Progression. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2015;101(3):246–55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25791280>
 36. Deng B, Molina J, Aubry MC, Sun Z, Wang L, Eckloff BW, et al. Clinical biomarkers of pulmonary carcinoid tumors in never smokers via profiling miRNA and target mRNA. *Cell Biosci* [Internet]. 2014;4(35):1–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25105010>
 37. Mairinger FD, Ting S, Werner R, Walter RFH, Hager T, Vollbrecht C, et al. Different micro-RNA expression profiles distinguish subtypes of neuroendocrine tumors of the lung: results of a profiling study. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc* [Internet]. 2014;27(12):1632–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2014.74>
 38. Lee HW, Lee EH, Ha SY, Lee CH, Chang HK, Chang S, et al. Altered expression of microRNA miR-21, miR-155, and let-7a and their roles in pulmonary neuroendocrine tumors. *Pathol Int*. 2012;62(9):583–91.
 39. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today* [Internet]. 2006;78(2):180–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=16847883>
 40. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* [Internet]. 2006;25(46):6220–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.onc.1209914>
 41. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(4):410–5.
 42. Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes*. 2004;116:281–97.
 43. Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2010;9:238.
 44. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA

- miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008;283(2):1026–33.
45. Rinaldi A, Poretti G, Kwee I, Zucca E, Catapano C, Tibiletti MG, et al. Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma [2]. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(2):410–2.
 46. Iorio M V., Croce CM. MicroRNAs in cancer: Small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5848–56.
 47. Yan L, Huang X, Shao Q, Huang M, Deng L. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Cold Spring Harb Lab Press*. 2008;2348–60.
 48. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA Signature Predicts Survival and Relapse in Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(1):48– 57.
 49. Calin G, Ferracin M, Cimmino A. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353:1793–801.
 50. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature [Internet]*. 2005;435(7043):834–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature03702>
 51. 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 Res*. 2004;64(11):3753–6.