

Daiane Rosolen

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs NO SORO DE
PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS (CPCNP)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-
Pasa

Florianópolis

Dezembro, 2018.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosolen, Daiane

Avaliação da expressão de microRNAs no soro de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) / Daiane Rosolen ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, 2018.

132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). 3. microRNAs. 4. Biomarcadores. 5. Diagnóstico. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs NO SORO DE
PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS (CPCNP)**

POR

Daiane Rosolen

**Tese julgada e aprovada em sua
Forma final pelo(a) Orientador e
Membros da Banca
Examinadora composta pelos
Professores Doutores:**

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a). Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Elena Riet Correa Rivero (UFSC – Membro Titular)

**Prof(a). Dr(a). Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos (UFPA –
Membro Titular)**

Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientador)

Prof(a). Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 17 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra Tânia Beatriz Creczynski Pasa, minha orientadora, obrigada pela oportunidade de ingressar em seu “supergrupo”, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, experiência, sabedoria e pelo significativo aprendizado científico durante o mestrado e o doutorado.

Aos meus queridos colegas e grandes amigos do laboratório GEIMM, minha segunda família, obrigada pela troca de experiências, pelas relevantes discussões científicas, pelo companheirismo, auxílio com os experimentos, pelos momentos de descontração e obrigada por mudarem a minha vida.

Ao Dr Fábio May da Silva, agradeço pelo esforço e pelo suporte clínico na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, obrigada pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho. Ao programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR) que possibilitou a implementação deste projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo suporte financeiro durante o doutorado.

Em especial, à minha família, agradeço pelo suporte, carinho e confiança. Ao Marcio, meu esposo e grande incentivador, obrigada pelo apoio incondicional e compreensão. À nossa pequena Alice, obrigada pelo carinho, amor e por tornar meus dias ainda mais felizes.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

“Não importa o que aconteça,
continue a nadar”.
(Walters Graham, 2003).

RESUMO

O Câncer de pulmão é uma doença silenciosa e invasiva, com elevada taxa de mortalidade. Malignidade que está associada à exposição ao tabaco e derivados, assim sendo, indivíduos tabagistas têm maior risco em desenvolver a doença quando comparados a não fumantes. Devido à ausência de sintomas iniciais o diagnóstico ocorre geralmente em fases tardias, limitando a abordagem terapêutica e diminuindo as taxas de sobrevivência dos pacientes. Neste sentido, torna-se imprescindível a busca por novas ferramentas diagnósticas que possam auxiliar na detecção do câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP), monitorar a evolução da doença, bem como rastrear indivíduos em risco. Os microRNAs (miRNAs) são pequenas sequências de RNA que regulam a expressão de genes, com elevada estabilidade em fluidos biológicos tais como soro, plasma, urina, entre outros. Diversos estudos já demonstraram que a expressão de miRNAs ocorre de forma distinta entre indivíduos saudáveis e doentes, ou seja, podem diferenciar pacientes com CPCNP de indivíduos livres da neoplasia. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos controles (fumantes e não fumantes) e selecionar alguns miRNAs como possíveis biomarcadores diagnósticos para esta neoplasia. Sendo assim, o RNA total das amostras foi extraído e por meio da técnica de microarranjo os miRNAs diferencialmente expressos foram identificados. Nesta etapa, foram avaliadas 21 amostras de pacientes com CPCNP e 13 de indivíduos saudáveis não fumantes. Entre os miRNAs alterados nas comparações realizadas (Pacientes com CPCNP fumantes × indivíduos saudáveis não fumantes; Adenocarcinoma × Carcinoma escamoso; Adenocarcinoma estágio inicial × Adenocarcinoma estágio avançado; Pacientes com CPCNP fumantes × indivíduos saudáveis não fumantes) os seguintes foram selecionados para a etapa de validação pela técnica de transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR): *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-6867-5p*, *hsa-miR-5006-5p* e o *hsa-miR-6807-5p*. A etapa de validação foi composta por 3 grupos amostrais, pacientes com CPCNP (n = 36), indivíduos saudáveis não fumantes (n = 15) e indivíduos saudáveis fumantes (n = 15). Os resultados mostraram que os níveis séricos dos miRNAs *hsa-miR-21-5p* ($P < 0,0001$), *hsa-miR-572* ($P = 0,0004$), *hsa-miR-5006-5p* ($P = 0,0006$), *hsa-miR-6807-5p* ($P = 0,0002$) e o *hsa-miR-6867-5p* ($P = 0,0005$) estavam significativamente elevados nos pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis não fumantes. Na comparação entre os pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos fumantes, os

níveis de expressão dos seguintes miRNAs estavam significativamente elevados, *hsa-miR-20a-5p* ($P = 0,0277$), *hsa-miR-21-5p* ($P < 0,0001$), *hsa-miR-24-3p* ($P = 0,0062$), *hsa-miR-5006-5p* ($P = 0,0343$), *hsa-miR-6807-5p* ($P < 0,0001$) e *hsa-miR-6867-5p* ($P < 0,0001$). Além disso, por meio da análise da curva ROC a maioria dos miRNAs alterados mostraram boa sensibilidade e especificidade quanto ao poder diagnóstico para o CPCNP. Na comparação entre pacientes com CPCNP e indivíduos saudáveis não fumantes a AUC para os miRNAs *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e o *hsa-miR-6867-5p* foram, respectivamente, 0,887 (sensibilidade: 75%; especificidade: 69%; $P < 0,001$), 0,843 (sensibilidade: 88%; especificidade: 66%; $P < 0,001$), 0,811 (sensibilidade: 80%; especificidade: 80%; $P < 0,001$), 0,385 (sensibilidade: 92%; especificidade: 66%; $P < 0,001$) e 0,854 (sensibilidade: 80%; especificidade: 72%; $P < 0,001$). Na comparação entre pacientes com CPCNP e indivíduos saudáveis fumantes a AUC para os miRNAs *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e *hsa-miR-6867-5p* foram, respectivamente, 0,699 (sensibilidade: 65%; especificidade: 86%; $P = 0,026$), 0,851 (sensibilidade: 83%; especificidade: 80%; $P < 0,001$), 0,749 (sensibilidade: 75%; especificidade: 66%; $P = 0,006$), 0,691 (sensibilidade: 74%; especificidade: 66%; $P = 0,033$), 0,957 (sensibilidade: 86%; especificidade: 66%; $P < 0,001$) e 0,954 (sensibilidade: 94%; especificidade: 91%; $P < 0,001$). A análise de bioinformática mostrou que a elevada expressão do *hsa-miR-5006-5p* pode contribuir com a baixa expressão do gene *FOXO3* (*Forkhead box O3*), tornando-se um biomarcador relacionado ao desenvolvimento do câncer de pulmão. A desregulação do *hsa-miR-6807-5p* pode ser uma indicação da expressão alterada de alguns fatores de transcrição da família ZNF (*Zinc finger family*), que, por sua vez, pode aumentar a progressão e o desenvolvimento do câncer. Sendo assim, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os sete miRNAs podem ser promissores candidatos a biomarcadores e serem úteis como uma nova estratégia pra auxiliar no diagnóstico do CPCNP, monitorar a progressão da doença e rastrear indivíduos em risco.

Palavras chave: miRNA, biomarcador, soro, diagnóstico, CPCNP, exposição ao tabaco.

ABSTRACT

Lung cancer is a silent and invasive disease, with a high mortality rate. This malignancy is associated with tobacco exposure and its derivatives, therefore, smokers have a higher risk of developing the disease when compared to nonsmokers. Due to the absence of initial symptoms, the diagnosis usually occurs in later stages, limiting the therapeutic approach and decreasing the patients' survival rates. Therefore, it is imperative to search for new diagnostic tools that can help the detection of non-small cell lung cancer (NSCLC), monitor disease progression, and track individuals at risk. MicroRNAs (miRNAs) are small RNA sequences that regulate gene expression, with high stability in biological fluids such as serum, plasma, urine, among others. Several studies have demonstrated that the expression of miRNAs occurs differently between healthy and sick individuals, i.e., they can differentiate patients with NSCLC from free neoplasm individuals. The aim of this study was to evaluate the miRNAs expression in serum samples of patients with NSCLC in relation to control individuals (smokers and nonsmokers) and to select the miRNAs as possible diagnostic biomarkers for the disease. Thus, total RNA of serum samples was extracted and by microarray technique, the differentially expressed miRNAs were identified. Samples from 21 patients with NSCLC and 13 healthy nonsmokers were evaluated in this step. Among altered miRNAs in the performed comparisons (NSCLC patients vs healthy non-smokers individuals; Adenocarcinoma vs Squamous cell carcinoma; Adenocarcinoma initial stage vs Adenocarcinoma advanced stage; smoker NSCLC patients vs healthy non-smokers individuals) the following miRNAs were selected for the validation set by the reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR): hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-572, hsa-miR-6867-5p, hsa-miR-5006-5p e o hsa-miR-6807-5p. The validation set was composed of three serum sample groups, 36 NSCLC cases, 15 healthy nonsmokers, and 15 healthy smokers. The results showed that serum levels of miRNAs hsa-miR-21-5p ($P < 0,0001$), hsa-miR-572 ($P = 0.0004$), hsa-miR-5006-5p ($P = 0.0006$), hsa-miR-6807-5p ($P = 0.0002$) e o hsa-miR-6867-5p ($P = 0.0005$) were significantly high in NSCLC patients in relation to healthy non-smokers individuals. In the comparison between NSCLC patients and healthy smokers individuals, the expression levels of the following miRNAs were significantly high hsa-miR-20a-5p ($P = 0.0277$), hsa-miR-21-5p ($P < 0.0001$), hsa-miR-24-3p ($P = 0.0062$), hsa-miR-5006-5p ($P = 0.0343$), hsa-miR-6807-5p ($P < 0.0001$), and hsa-miR-6867-5p ($P < 0.0001$). Besides that, by ROC curve analysis, the most of altered miRNAs showed a great sensitivity and specificity in relation to NSCLC diagnostic.

In the comparison between NSCLC patients and healthy non-smokers individuals the AUC for miRNAs hsa-miR-21-5p, hsa-miR-572, hsa-miR-5006-5p, hsa-miR-6807-5p e o hsa-miR-6867-5p were, respectively, 0.887 (sensitivity: 75%; specificity: 69%; $P < 0.001$), 0.843 (sensitivity: 88%; specificity: 66%; $P < 0.001$), 0.811 (sensitivity: 80%; specificity: 80%; $P < 0.001$), 0.835 (sensitivity: 92%; specificity: 66%; $P < 0.001$), and 0.854 (sensitivity: 80%; specificity: 72%; $P < 0.001$). In the comparison between NSCLC patients and healthy smokers individuals the AUC for the miRNAs hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-5006-5p, hsa-miR-6807-5p, and hsa-miR-6867-5p were, respectively, 0.699 (sensitivity: 65%; specificity: 86%; $P = 0.026$), 0.851 (sensitivity: 83%; specificity: 80%; $P < 0.001$), 0.749 (sensitivity: 75%; specificity: 66%; $P = 0.006$), 0.691 (sensitivity: 74%; specificity: 66%; $P = 0.033$), 0.957 (sensitivity: 86%; specificity: 66%; $P < 0.001$), and 0.954 (sensitivity: 94%; specificity: 91%; $P < 0.001$). The bioinformatic analysis showed that the high expression level of hsa-miR-5006-5p may contribute for the down-regulation of FOXO3 gene, becoming an early biomarker of cancer development. The deregulation of hsa-miR-6807-5p may be an indication of altered expression of some transcription factors like ZNF family, which in turn may increase the progression and development of cancer. Thus, the results presented in this study suggest that these seven altered miRNAs might be promising biomarkers for auxiliary diagnosis of NSCLC, monitor disease progression, and track individuals at risk.

Keywords: miRNA, biomarker, serum, diagnosis, CPCNP, tobacco exposition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Carcinogênese induzida pelo tabaco.	31
Figura 2 – Estádios do câncer de pulmão (I, II, III e IV).	36
Figura 3 – Principais mutações encontradas no CPCNP.....	37
Figura 4 – Biogênese dos miRNAs.	42
Figura 5 – Fluxograma representando os grupos amostrais do presente estudo.	52
Figura 6 - Características dos pacientes com CPCNP participantes da etapa de microarranjo. (A) Porcentagem de casos relacionados à exposição ao tabaco; (B) Porcentagem de casos relacionados ao sub-tipo histológico; (C) Porcentagem de casos relacionados aos estádios da doença.	61
Figura 7 – Eletroferograma (amostra P13).....	62
Figura 8 – Matriz de expressão dos 53 miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com CPCNP em comparação ao grupo controle.	63
Figura 9 – Gráficos <i>box plot</i> de seis miRNAs alterados que apresentaram elevada significância na comparação de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) em relação ao grupo controle.	67
Figura 10 – Gráficos <i>box plot</i> dos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre adenocarcinoma (AD) e carcinoma escamoso (CE) nos pacientes com CPCNP.	69
Figura 11 – Gráficos <i>box plot</i> dos miRNAs alterados nos pacientes com adenocarcinoma no estadio inicial em relação ao estadio avançado.....	71
Figura 12 – Diagrama de Venn dos miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP e nos pacientes CPCNP fumantes em relação ao controle.....	74
Figura 13 – Diagrama de Venn dos miRNAs diferencialmente expressos nas seguintes comparações: A) CPCNP × Controle; B) CPCNP Fumantes × Controle; C) AD estadio inicial × AD estadio avançado e D) CE × AD.....	77
Figura 14 – Características dos pacientes com CPCNP participantes da etapa de validação. (A) Porcentagem de casos relacionados à exposição ao tabaco; (B) Porcentagem de casos relacionados ao sub-tipo histológico; (C) Porcentagem de casos relacionados aos estádios da doença.	80

Figura 15 – Eficiência da qPCR calculada pelo <i>software LinReg</i>.....	81
Figura 16 – Expressão relativa de miRNAs séricos (A – H) em pacientes com CPCNP e indivíduos controle (fumantes e não fumantes).	83
Figura 17 – Curva <i>ROC</i> para miRNAs séricos (Comparação: Pacientes CPCNP × Indivíduos saudáveis não fumantes).	87
Figura 18 – Curva <i>ROC</i> para miRNAs séricos (Comparação: Pacientes CPCNP × Indivíduos saudáveis fumantes).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo (exceto pele não melanoma).	28
Tabela 2 – Estadiamento por grupos de câncer de pulmão.	35
Tabela 3 – Características dos grupos utilizados na análise de microarranjo.	60
Tabela 4 – miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com CPCNP em relação ao grupo controle.....	64
Tabela 5 – miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com adenocarcinoma em relação aos pacientes com carcinoma escamoso. .	68
Tabela 6 – miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com adenocarcinoma no estadio inicial em relação ao estadio avançado.....	70
Tabela 7 – miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP fumantes em relação aos indivíduos não fumantes (controle).	72
Tabela 8 – miRNAs diferencialmente expressos na análise de microarranjo selecionados para validação por RT-qPCR.	76
Tabela 9 – Características dos grupos utilizados na etapa de validação.	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estadiamento do câncer de pulmão com a definição dos descritores.....	34
Quadro 2 – Classificação dos estadios do câncer de pulmão com os descritores TNM.....	35
Quadro 3 – <i>Primers</i> utilizados na reação de qPCR.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD – Adenocarcinoma

ALK – Anaplastic lymphoma kinase

Akt – Serine/threonine protein kinase

CE – Carcinoma escamoso

CPCNP – Câncer de pulmão de células não pequenas

CPCP – Câncer de pulmão de células pequenas

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGFR – Epidermal growth factor

FC – *Fold change*

FOX30 - Forkhead box O3

HDL – High density lipoprotein

IASCL – International Association for the study of Lung Cancer

KRAS – Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene

MAPK – Mitogen Activated Protein Kinases)

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – microRNA

NSCLC – Non small cell lung cancer

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDCD4 – Programmed cell death protein 4

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

RISC - RNA-induced silencing complex

ROC – Receiver operating characteristic

STAT – Signal transducers and activators of transcription

TGFβR2 – Transforming growth factor β receptor 2

UTR – Untranslated region

vs - *versus*

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	25
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Câncer de pulmão	27
2.1.1	Epidemiologia e fatores de risco.....	27
2.1.2	Classificação histológica e estadiamento	31
2.1.3	Alterações moleculares no CPCNP	37
2.1.4	Diagnóstico do câncer de pulmão	40
2.2	microRNAs (miRNAs).....	41
2.2.1	Perfil de miRNAs circulantes associados ao CPCNP	45
3.	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo geral.....	49
3.2	Objetivos específicos	49
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Aspecto ético.....	51
4.2	Amostras.....	51
4.2.1	Aquisição e seleção das amostras	51
4.2.2	Crterios de incluso da populao de estudo	52
4.2.3	Crterios de excluso da populao de estudo	52
4.2.4	Coleta e Processamento das amostras.....	53
4.3	Extrao de RNA total	53
4.4	Quantificao do RNA total.....	54

4.5	Integridade do RNA total.....	54
4.6	Análise de Microarranjo.....	54
4.7	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR).....	56
4.8	Primers utilizados na reação de qPCR.....	56
4.9	Análise de bioinformática.....	57
4.10	Análise estatística.....	58
5.	RESULTADOS.....	59
5.1	Identificação de miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes com CPCNP por meio da técnica de microarranjo.....	59
5.1.1	Características dos indivíduos participantes da análise de microarranjo.....	59
5.1.2	Análise da integridade do RNA total.....	61
5.1.3	miRNAs diferencialmente expressos no CPCNP em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis não fumantes).....	62
5.1.4	miRNAs diferencialmente expressos em relação aos subtipos histológicos.....	68
5.1.5	miRNAs diferencialmente expressos em relação ao adenocarcinoma nos estadios inicial e avançado.....	69
5.1.6	miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP fumantes em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis não fumantes).....	72
5.1.7	miRNAs selecionados para etapa de validação por RT-qPCR	75
5.2	Validação por RT-qPCR.....	77
5.2.1	Características dos grupos participantes da etapa de validação	78
5.2.2	Eficiência das reações de qPCR.....	80

5.2.3	Expressão relativa dos miRNAs selecionados	81
5.3	Análise de curva <i>ROC</i>	86
5.4	Análise de bioinformática	90
6.	DISCUSSÃO	91
7.	CONCLUSÃO.....	99
8.	PERSPECTIVAS	101

REFERÊNCIAS 103

APÊNCIDE A – CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DOS PACIENTES COM CPCNP..... 119

APÊNCIDE B – CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DO GRUPO CONTROLE COMPREENDENDO POR INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS NÃO FUMANTES..... 120

APÊNCIDE C – ELETROFEROGRAMAS DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL DESTE ESTUDO (QUADRO 1 – PACIENTES COM CPCNP E QUADRO 2 – INDIVÍDUOS CONTROLE)..... 121

APÊNCIDE D – CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DO GRUPO CONTROLE COMPREENDIDO POR INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS FUMANTES. 124

APÊNCIDE E – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO AO SEXO DOS PACIENTES COM CPCNP..... 125

APÊNCIDE F – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO AO TABACO NOS PACIENTES COM CPCNP..... 126

APÊNCIDE G – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO AOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO CPCNP NOS PACIENTES ACOMETIDOS PELA DOENÇA.127

APÊNCIDE H – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO À AOS ESTADIOS DA DOENÇA NOS PACIENTES COM CPCNP. 128

APÊNDICE I – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO À AOS ESTÁDIOS TNM I A IV NOS PACIENTES COM CPCNP..... 129

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)..... 131

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de pulmão foi considerado uma doença rara até o início do século XX. Atualmente é uma das mais frequentes neoplasias malignas na população mundial, tornando-se a segunda causa mais importante de morte por câncer no mundo (SIEGEL *et al.*, 2018). O câncer de pulmão é altamente letal e está associado à exposição de vários agentes externos como o tabaco e seus derivados. Portanto, indivíduos tabagistas têm um risco maior de desenvolver a doença quando comparados a não fumantes. O câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) é o tipo histológico mais frequente, representa aproximadamente 85% dos casos, e compreende três subtipos histológicos principais, o adenocarcinoma, o carcinoma escamoso e o carcinoma de grandes células, distribuídos tanto em homens quanto em mulheres (INCA, 2018b; WHO, 2018).

Devido à ausência de sintomas clínicos e programas efetivos de rastreamento, a maioria dos casos é diagnosticada em fases avançadas da doença, quando a localização do tumor não está restrita ao sítio inicial, tendo metastatizado para outros órgãos, limitando a conduta terapêutica (GRIDELLI *et al.*, 2015). Além disso, levando em consideração a baixa sobrevida e à alta taxa de mortalidade dos pacientes com câncer de pulmão (WHO, 2018) torna-se imprescindível à busca por novos métodos diagnósticos que possam auxiliar na descoberta da doença em fases iniciais objetivando o sucesso terapêutico. Por estas razões, o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas minimamente invasivas, rápidas e confiáveis são clinicamente importantes para auxiliar na detecção desta neoplasia.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas sequências de RNA (~22 nucleotídeos) reguladores da expressão gênica pós-transcricional que vêm sendo amplamente estudados como biomarcadores promissores para auxiliar no diagnóstico e monitoramento do câncer, inclusive o de pulmão. Devido à atuação destes pequenos RNAs na regulação de grande parte dos genes codificadores de proteínas, participam também da regulação de vários processos biológicos celulares, como desenvolvimento de tecidos, funções do sistema imune, diferenciação, proliferação e morte celular (BARTEL, 2009). Uma vez desregulados, estão frequentemente associados com a patogênese das doenças humanas como o câncer (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; YANAIHARA *et al.*, 2006).

Diversos estudos já demonstraram que a expressão de miRNAs em fluidos biológicos ocorre de forma diferente em condições normais e patogênicas, ou seja, podem diferenciar pacientes acometidos pelo CPCNP de indivíduos sem a neoplasia (LE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016). Nesse sentido, os miRNAs circulantes são extremamente promissores e podem ser úteis como uma potente ferramenta diagnóstica e prognóstica para o CPCNP, uma vez que são detectados por meio de técnicas minimamente invasivas.

O presente estudo buscou avaliar a expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes com CPCNP em relação à indivíduos sem a doença, fumantes e não fumantes. Por meio deste trabalho espera-se que os miRNAs alterados possam contribuir para o futuro diagnóstico e prognóstico dos pacientes acometidos pelo CPCNP, bem como, serem úteis em programas de rastreamento para indivíduos que fazem parte dos grupos de risco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de pulmão

O câncer caracteriza-se pelo crescimento de células anormais que dividem-se de forma acelerada, podem invadir o tecido circundante e atingir locais distantes do órgão afetado (INCA, 2018a; WHO, 2018). Entre todos os tipos de câncer, o de pulmão caracteriza-se por ser uma doença silenciosa, altamente invasiva e na maioria dos casos o diagnóstico ocorre em fases tardias, limitando a abordagem terapêutica e diminuindo as taxas de sobrevivência dos pacientes (GRIDELLI *et al.*, 2015).

O pulmão é um órgão complexo, composto por vários tipos celulares com funções distintas que suportam a troca gasosa. Com membranas alveolares extremamente finas, a passagem de oxigênio e dióxido de carbono entre o sangue e o ambiente ocorre frente à exposição a gases tóxicos e contaminantes com partículas finas, bem como os agentes infecciosos. As grandes partículas inaladas são eliminadas pela ação ciliar nas vias aéreas superiores, enquanto que os agentes infecciosos são eliminados por células do sistema imune. Além disso, esta população de células variadas podem sofrer alterações que modificam o equilíbrio de divisão e apoptose, podendo ocasionar o câncer de pulmão (WEIBEL, 2009). Neste sentido, o acúmulo de alterações que levam a esta neoplasia surge frequentemente da exposição prolongada a vários fatores externos e ambientais como o tabaco. Uma série de modificações morfológicas ocorre no epitélio brônquico progredindo de hiperplasia de células basais para metaplasia, displasia grave ao carcinoma *in situ* e finalmente o câncer de pulmão (KERR, K., 2001).

2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

O câncer é uma das principais causas de morte em todo mundo, responsável por 8,8 milhões de óbitos no ano de 2015, e para o ano de 2018 é estimado 9,6 milhões de óbitos. O câncer de pulmão está relacionado com elevadas taxas de mortalidade conforme demonstrado na última estatística mundial, em que 1,69 milhões de casos foram relacionados com óbito no ano de 2015 (WHO, 2018).

Para o Brasil, no ano de 2018 foram estimados 31.270 novos casos, sendo 18.740 entre homens e 12.530 entre mulheres. E para o estado de Santa Catarina foi estimado o aparecimento de 1.730 novos casos. Como pode ser observado na Tabela 1, o câncer de pulmão está entre os 10 tipos de câncer mais incidentes, tanto para homens, quanto para mulheres, conforme estimado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2018 (INCA, 2018d).

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo (exceto pele não melanoma).

Homens			Mulheres		
Localização primária	Casos	%	Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7	Mama	59.700	29,5
Traqueia, Brônquio, Pulmão	18.740	8,7	Cólon e Reto	18.980	9,4
Cólon e Reto	17.380	8,1	Colo do útero	16.370	8,1
Estômago	13.540	6,3	Traqueia, Brônquio, Pulmão	12.530	6,2
Cavidade Oral	11.200	5,2	Glândula Tireoide	8.040	4,0
Esôfago	8.240	3,8	Estômago	7.750	3,8
Bexiga	6.690	3,1	Corpo do útero	6.600	3,3
Laringe	6.390	3,0	Ovário	6.150	3,0
Leucemias	5.940	2,8	Sistema Nervoso Central	4.860	2,7
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7	Leucemias	4.860	2,4

Fonte: INCA (2018d).

O câncer de pulmão é caracterizado por ser uma doença relacionada a senescência, com o contínuo encurtamento dos telômeros durante ciclos repetidos de replicação celular e maiores chances de danos no DNA levando em consideração o fator “tempo”(GROOT e MUNDEN, 2012). Embora o câncer de pulmão possa manifestar-se em indivíduos com idade abaixo dos 50 anos, continua sendo incomum o aparecimento da doença neste grupo etário (DELA CRUZ *et al.*, 2011).

A incidência de câncer de pulmão bem como a mortalidade relacionada estão muito próximas, devido à baixa sobrevida dos pacientes. Apesar dos avanços tecnológicos quanto ao diagnóstico e ao tratamento é importante salientar que a taxa de sobrevida média em cinco anos para o sexo masculino é de 15% e para o feminino é de 21%. Somente 16% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados em estágios em que o tumor ainda está localizado (sem metástases), nestes a taxa de sobrevida é de 55% (ACS, 2018).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 30% e 50% das mortes por câncer poderiam ser evitadas, por meio da identificação dos fatores de risco e dessa maneira desenvolver fatores de prevenção (WHO, 2018). Entre os principais fatores de risco para o câncer de pulmão são destacados os fatores genéticos, a exposição ocupacional a agentes químicos (asbesto, urânio, arsênico, cromo, cádmio) e o tabaco e seus derivados que estão associados a 90% dos casos diagnosticados (TRAVIS *et al.*, 2004; FISS, 2016).

O tabaco tornou-se amplamente disponível na forma de cigarros na metade do século XIX e o consumo nos Estados Unidos manteve-se modesto até o início da primeira Guerra Mundial. Foi estimado por Wynder e Graham (1950) que um adulto consumia em média 100 cigarros por ano em 1900, época em que o tabaco já era evidenciado como um possível agente etiológico para o câncer de pulmão. Cinquenta anos depois, o consumo subiu para 3.500 cigarros ano/pessoa e atingiu o pico máximo de consumo na década de 60 com aproximadamente 4.400 cigarros ano/pessoa, e desde a década de 80 até o ano 2000 houve um grande declínio no consumo per capita (WARNER e MENDEZ, 2010). Com relação à realidade brasileira, foi demonstrado que a prevalência de indivíduos fumantes reduziu de 15,7% no ano de 2006 para 10,1% no ano de 2017 (INCA, 2018e). O Brasil está em oitavo lugar no ranking mundial quanto ao número de fumantes, no entanto, está em primeiro lugar quando se trata da redução do número de pessoas que consomem tabaco (GBD, 2017). É importante salientar que o risco de câncer de pulmão aumenta de forma proporcional conforme o número de cigarros fumados por dia, o tempo de duração do hábito de fumar, grau de inalação, tabagismo precoce e o conteúdo de nicotina, enquanto que, ao cessar o hábito de fumar o risco diminui proporcionalmente (HOWLADER N *et al.*, 2014; FISS, 2016). Mong e colaboradores (2011) enfatizam que o risco de câncer de pulmão em ex-fumantes que há 15 anos cessaram o uso de tabaco reduz para 50%.

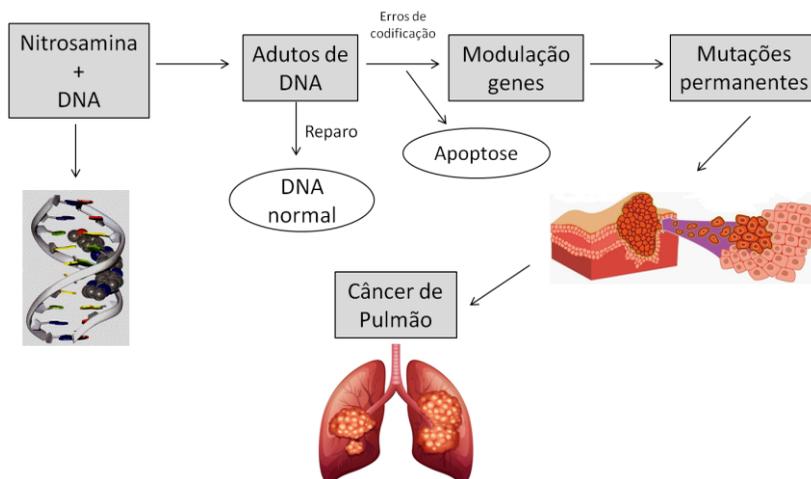
Além do risco para indivíduos fumantes, o tabagismo passivo tem gerado grande preocupação por ter sido relacionado com aproximadamente 30% dos casos de câncer de pulmão em indivíduos que não possuem o hábito de fumar. É importante enfatizar que fumantes secundários são inalantes passivos das partículas geradas pelo tabaco que por sinal penetram facilmente na árvore brônquica, fator que aumenta o risco de câncer de pulmão (STELIGA e DRESLER, 2011; FISS, 2016). Outro dado alarmante foi elucidado pelo estudo de Greemberg e colaboradores (1984) no qual foi observada a presença de nicotina e seu maior metabólito, a cotinina na urina e saliva de crianças em que as babás eram fumantes. As concentrações dessas substâncias foram significativamente maiores quando comparadas ao grupo que não estava exposto.

Conforme mencionado, o tabaco é o principal fator de risco para o câncer de pulmão e está associado ao aumento da exposição sistêmica a agentes carcinogênicos, radicais livres, acúmulo de mutações, estresse oxidativo sistêmico e inflamação. A fumaça liberada pelo tabaco contém mais de 7.000 componentes já identificados, sendo que mais de 70 são agentes carcinogênicos. Estas substâncias promovem dano ao DNA e a capacidade de reparo é significativamente menor em indivíduos com câncer de pulmão do que em indivíduos não portadores desta neoplasia (WYNDER e HOFFMANN, 1994; WEI *et al.*, 1996; BABIZHAYEV *et al.*, 2011; LOURENÇO e KIRCHENCHTEJN, 2016).

Os agentes carcinogênicos do tabaco podem levar ao desenvolvimento do câncer de pulmão em “um” em cada “nove” fumantes (DELA CRUZ *et al.*, 2011). Estas substâncias podem ser hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), aminas aromáticas, *N*-nitrosaminas, outros compostos orgânicos e inorgânicos tais como o benzeno, cloreto de vinila, arsênico, polônio e cromo. Entre estes, as *N*-nitrosaminas parecem estar fortemente ligadas ao câncer de pulmão. Na carcinogênese induzida pelo tabaco as nitrosaminas podem ligar-se ao DNA e formar adutos, ou seja, o DNA ligado covalentemente a um composto químico que pode causar câncer em indivíduos fumantes. Sendo assim, em uma situação normal durante o processo de reparo do DNA estes adutos podem ser removidos e ocorrer a reparação, ou então as células com DNA danificado podem sofrer apoptose. Por outro lado, nos casos em que ocorre falha nos mecanismos normais de reparo para a remoção dos adutos, as nitrosaminas podem mediar à ativação de vias de sinalização que incluem a modulação de oncogenes e supressores tumorais, resultando em mutações permanentes. Se esta mutação ocorrer

na região crítica de um oncogene, como *KRAS* ou em um gene supressor tumoral como o *TP53*, ocorre perda dos mecanismos de controle levando a proliferação celular exacerbada e por fim o câncer de pulmão (WYNDER e HOFFMANN, 1994; AKOPYAN e BONAVIDA, 2006; HECHT, 2012) (Figura 1).

Figura 1 – Carcinogênese induzida pelo tabaco.



Fonte: Figura adaptada de: HECHT (2012).

O acúmulo de alterações regulatórias que levam ao câncer de pulmão pode surgir a partir de anos de exposição à fumaça do tabaco, resultando em danos estruturais que se manifestam como doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema. A exposição ao fumo pode levar a uma série bem caracterizada de alterações morfológicas do epitélio brônquico, progredindo de hiperplasia basocelular para metaplasia, displasia severa a carcinoma in situ e, finalmente, o câncer de pulmão (KERR, K. M., 2001; GRIDELLI *et al.*, 2015).

2.1.2 Classificação histológica e estadiamento

Baseado na histologia, o câncer de pulmão é classificado em dois tipos principais: o câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) e o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). O CPCP

compreende 15% dos casos, enquanto que o CPCNP é responsável por aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão. O CPCNP divide-se histologicamente em três subtipos: adenocarcinoma, carcinoma escamoso ou epidermóide e carcinoma de grandes células (TRAVIS *et al.*, 2015; INCA, 2018c). Entre estes, o adenocarcinoma caracteriza-se pela histologia glandular e/ou produção de mucina intracitoplasmática, localiza-se com frequência nas regiões periféricas, no espaço alveolar, é o subtipo histológico mais frequente entre todos os tipos de câncer de pulmão, representando aproximadamente 40% dos casos. O carcinoma escamoso possui frequência de aproximadamente 20%, é caracterizado pela diferenciação escamosa, com a presença de queratina e/ou desmossomos intercelulares, similar ao epitélio colunar pseudoestratificado da traqueia e vias aéreas superiores e localiza-se classicamente nas porções proximais da árvore traqueobrônquica. O carcinoma de grandes células é responsável por aproximadamente 3% de todos os carcinomas pulmonares, localiza-se frequentemente no parênquima pulmonar periférico e apresenta-se tipicamente como grandes tumores necróticos (DAVIDSON *et al.*, 2013; TRAVIS *et al.*, 2015).

Embora o câncer de pulmão possa ser dividido em subtipos, a distinção mais importante está entre CPCP e CPCNP, isto ocorre devido às principais diferenças clínicas dos pacientes como exemplo a disseminação metastática e resposta a terapia. Neste contexto, a classificação histológica contribui para a abordagem terapêutica, uma vez que cada tipo de tumor possui um direcionamento diferente (TRAVIS e REKHTMAN, 2011).

Além da definição histológica dos tumores primários de pulmão, o sistema de estadiamento TNM (do inglês *Tumor – Node – Metastasis*) fornece um conjunto maior de dados relacionados à doença. Baseia-se na extensão anatômica da neoplasia com informações mais precisas que se correlacionam com a evolução e o prognóstico dos pacientes. Como a localização do tumor, se houve disseminação tumoral linfodonal e/ou metástases em outras estruturas do organismo. Ainda, é importante salientar que os principais órgãos relacionados com metástases pulmonares são cérebro, ossos, supra-renais e fígado (GOLDSTRAW *et al.*, 2011; YOUNES, 2016). O sistema TNM é empregado para todos os tipos de câncer de pulmão e além de determinar a extensão tumoral auxilia na escolha da melhor estratégia terapêutica para cada caso. Além disso, o baixo estadio da doença está associado a um melhor prognóstico, no entanto, nenhum profissional pode prever exatamente o

tempo de vida do paciente, uma vez que cada indivíduo responde de forma diferente ao tratamento (NEGRI, 2016).

Com base nas definições da *IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer)* (2018) os descritores do sistema TNM podem ser visualizados no Quadro 1, o estadiamento por grupos na Tabela 2 e os estadios do câncer de pulmão com os descritores no Quadro 2.

Quadro 1 – Estadiamento do câncer de pulmão com a definição dos descritores.

<p>Descritor T (Tumor primário)</p> <p>Tx – tumor primário não pode ser visualizado ou tumor caracterizado por citologia de escarro ou lavado brônquico.</p> <p>T0 – sem evidência de tumor</p> <p>Tis – carcinoma in situ</p> <p>T1mi – Adenocarcinoma minimamente invasivo</p> <p>T1 – tumor ≤ 3 no maior diâmetro</p> <p>T1a – tumor ≤ 1 cm</p> <p>T1b – tumor > 1 cm e ≤ 2 cm</p> <p>T1c – tumor > 2 cm e ≤ 3 cm</p> <p>T2 – Tumor > 3 cm e ≤ 7 cm ou envolvimento do brônquio principal a mais de 2 cm da carina principal, invasão da pleura visceral, atelectasia ou pneumonia obstrutiva sem envolvimento de todo o pulmão:</p> <p>T2a – tumor > 3 cm e ≤ 5 cm</p> <p>T2b – tumor > 5 cm ≤ 7 cm</p> <p>T3 – tumor > 7 cm ou tumor de qualquer tamanho que invade a parede torácica, diafragma, nervo frênico, pleura mediastinal, pericárdio parietal ou tumor do brônquio principal</p> <p>T4 – tumor de qualquer tamanho que invade mediastino, coração, grandes vasos, traqueia, nervo laríngeo recorrente, esôfago Carina, corpo vertebral ou nódulos tumorais em diferentes lobos ipsilaterais</p>
<p>Descritor N (Linfonodos)</p> <p>Nx – linfonodos não podem ser avaliados</p> <p>N0 – ausência de metástases linfonoidais</p> <p>N1 – metástases em linfonodos peribrônquicos e/ou hiliares ipsilaterais e/ou linfonodos intrapulmonares</p> <p>N2 – metástases em mediastino ipsilateral e/ou linfonodos subcarinais</p> <p>N3 – metástases em mediastino contralateral, hilo contralateral, escaleno ipsilateral ou contralateral, ou linfonodos supraclaviculares</p>
<p>Descritor M (Metástase)</p> <p>M0 – ausência de metástase à distância</p> <p>M1 – metástase à distância:</p> <p>M1a – nódulo tumoral em lobo contralateral, nódulo pleural, derrame pleural ou pericárdio maligno</p> <p>M1b – única metástase extratorácica em um único órgão</p> <p>M1c – múltiplas metástases extratorácicas em vários órgãos</p>

Fonte: IASLC (2018) e INCA (2018c).

Tabela 2 – Estadiamento por grupos de câncer de pulmão.

	N0	N1	N2	N3
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1c	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIIB	IIIA	IIIB
T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (nódulos mesmo lobo)	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (extensão mediastinal)	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV
M1c	IV	IV	IV	IV

Fonte: IASLC (2018) e INCA (2018c).

Quadro 2 – Classificação dos estadios do câncer de pulmão com os descritores TNM.

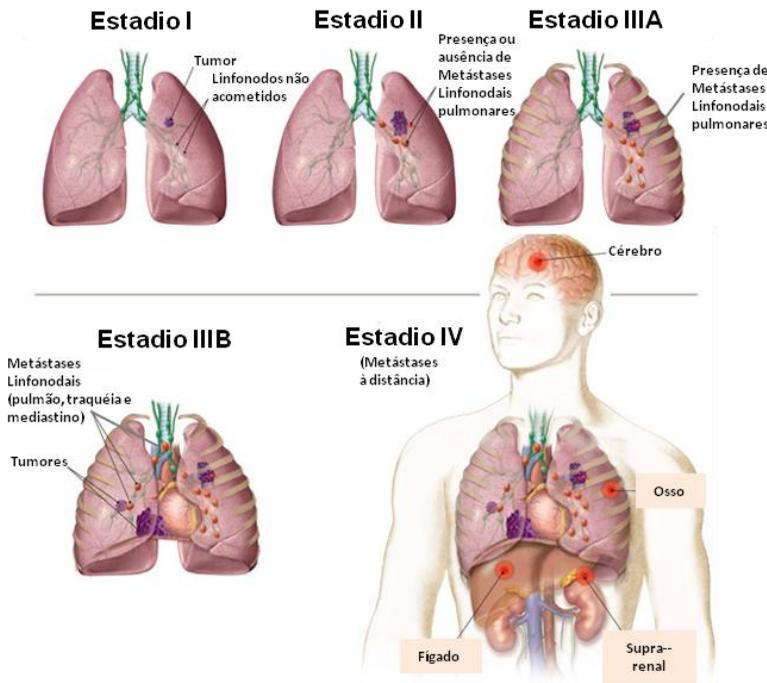
Estadio IA (T1a, T1b, T1c, N0, M0)
Estadio IB (T2a, N0, M0)
Estadio IIA (T1a/T1b/T1c, N1, M0; T2a, N1, M0; T2b, N0, M0)
Estadio IIB (T2b, N1, M0; T3, N0, M0)
Estadio IIIA (T1 a T4, N2, M0; T3, N1, M0; T4, N0 ou N1, M0);
Estadio IIIB (Qualquer T, N3, M0; T4, N2, M0)
Estadio IV (Qualquer T, qualquer N, M1a, M1b e/ou M1c)

Fonte: IASLC (2018) e INCA (2018c).

Conforme dados expostos no Quadro 2 os estadios clínicos do câncer de pulmão podem ser classificados resumidamente em estadio I, II, III e IV. Nos estadios clínicos I e II a chance de cura é maior e o tratamento cirúrgico ainda é considerado terapia de escolha. Nos casos em que o tumor encontra-se localizado (estadio I e II) a taxa de

sobrevida mundial em cinco anos varia de 50 a 80% (ABRÃO, 2016; SARDENBERG, 2016). Em contrapartida, nos estádios III os pacientes geralmente são encaminhados para a quimioterapia e/ou radioterapia, e em raras situações podem ser submetidos ao tratamento cirúrgico, uma vez que a doença está localmente avançada pelo extenso acometimento de linfonodos regionais e possível invasão mediastinal. A taxa de sobrevida em cinco anos é estimada em aproximadamente 35% (Figura 2) (HANRIOT, 2016; TERRA, 2016).

Figura 2 – Estádios do câncer de pulmão (I, II, III e IV).



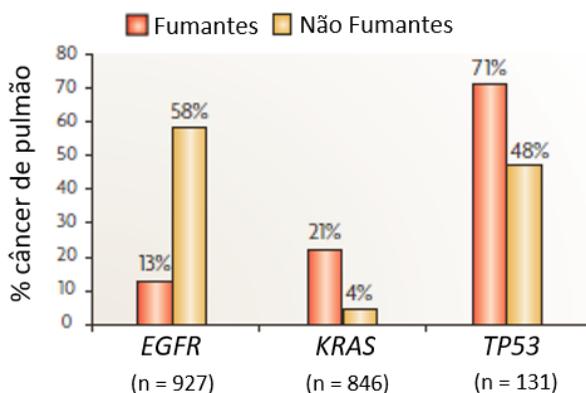
Estádio I: Tumor não superior a 3 cm para o estágio IA, até 5 cm para o estágio IB, sem acometimento linfonodal; Estádio II: Tumor de até 7cm de diâmetro, pode ou não acometer linfonodos pulmonares. Estádio III: IIIA) Acometimento de estruturas circundantes, com elevada disseminação linfonodal no mesmo lado do tumor. IIIB) Mais tumores podem estar presentes com disseminação para os linfonodos e lobo pulmonar oposto, traqueia e mediastino. Estádio IV: Presença de metástases à distância, como cérebro, ossos, fígado e supra-renais. Fonte: Adaptado de: Moore (2016).

E por fim, o estadió IV, no qual mais de 50% dos pacientes são diagnosticados, a sobrevivida em cinco anos não atinge 5%. Nestes casos em que as metástases à distância fazem parte do quadro clínico o tratamento sistêmico representa o foco principal da abordagem terapêutica (Figura 2) (CRUZ *et al.*, 2016).

2.1.3 Alterações moleculares no CPCNP

O câncer de pulmão é uma doença heterogênea, com importância não somente das células epiteliais, mas também do microambiente tumoral. As células de câncer de pulmão estão intimamente associadas à matriz celular, células mesenquimais tais como fibroblastos, células do sistema imune e a estrutura vascular (DUPAGE *et al.*, 2011; QUAIL e JOYCE, 2013). O microambiente tumoral possui um importante papel em determinar as características dos tumores de CPCNP. Existe a probabilidade que alterações genéticas e fatores microambientais contribuam para a identidade dos tumores pulmonares (CHEN *et al.*, 2014). Nos últimos anos, vários estudos têm evidenciado as vias que contribuem para a carcinogênese pulmonar e os principais genes envolvidos no CPCNP de indivíduos fumantes e não fumantes são: *EGFR*, *KRAS* e *TP53* (SUN *et al.*, 2007; TRAVIS *et al.*, 2015; PASTORKOVA *et al.*, 2016) Figura 3.

Figura 3 – Principais mutações encontradas no CPCNP.



Fonte: Figura adaptada de: Sun *et al.* (2007):

- **Via de sinalização *EGFR* (*epidermal growth factor*):** As proteínas *EGFR* pertencem à família de receptores tirosina cinase e estão superexpressas em muitos tipos de câncer inclusive em 50% dos casos de câncer de pulmão. Ao unirem-se a ligantes específicos, as proteínas *EGFR* iniciam a cascata de sinalização desencadeando os eventos de proliferação celular, angiogênese, invasão e metástases. Estes eventos são iniciados pela ativação de três principais vias: *Akt* (sobrevivência celular por meio da inibição da apoptose), a *MAPK* (proliferação aumentada) e a *STAT* (oncogênese) (SHEPHERD *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2007). As mutações *EGFR* ocorrem especificamente nos casos de adenocarcinomas em indivíduos não expostos ao tabaco, sendo a primeira mutação associada a não fumantes (KOSAKA *et al.*, 2004; PHAM *et al.*, 2006).
- **Mutações *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene*):** As proteínas Ras na forma ativa estão envolvidas no processo de proliferação celular. As mutações oncogênicas *KRAS* resultam na perda da atividade das GTPases que são enzimas requeridas para desativar as proteínas Ras. Na ausência das GTPases, as proteínas mutadas permanecem constitutivamente ativadas permitindo a proliferação de células cancerígenas (DOWNWARD, 2003). As mutações *KRAS* no câncer de pulmão estão limitadas aos casos de CPCNP, com maior predomínio em adenocarcinomas, raramente estão presentes no carcinoma escamoso (TAM *et al.*, 2006). Além disso, as mutações *KRAS* ocorrem mais frequentemente em indivíduos com CPCNP expostos ao tabaco e estão relacionadas com sobrevida baixa (MASCAUX *et al.*, 2004).
- **Gene *TP53*:** O gene *TP53* é codificador da proteína p53. O gene supressor tumoral *TP53* é o que apresenta mutações mais frequentemente nos casos de câncer de pulmão, ocorrendo em aproximadamente 50% dos casos de CPCNP, tanto em indivíduos fumantes quanto em não-fumantes e mais comumente nos casos de carcinoma escamoso quando comparado aos adenocarcinomas (CHENG *et al.*, 2003; SENGUPTA e HARRIS, 2005). Este gene é responsável pela regulação do ciclo celular na interface G1-S e possui papel importante na indução da apoptose nas células com dano no DNA. Ainda, a proteína p53 na forma selvagem é reguladora do crescimento celular e mutações no gene *TP53* podem anular a produção da proteína ou então produzi-la de forma

ineficaz. A função desta proteína é extremamente relevante no processo de supressão tumoral, cuja ausência implica significativamente no risco de carcinogênese (STEELS *et al.*, 2001; LE CALVEZ *et al.*, 2005).

Além das alterações acima mencionadas, outras mutações que podem contribuir com a patogênese do CPCNP têm sido descritas. O gene *ALK* (*Anaplastic lymphoma kinase*), um receptor tirosina cinase, foi descrito por estar envolvido no início e na progressão de vários tipos de câncer, inclusive no CPCNP. Uma variedade de alterações no gene *ALK* tais como mutações, expressão aumentada, amplificação, translocações ou outros rearranjos estruturais têm sido implicadas na tumorigênese do CPCNP (SODA *et al.*, 2007; HALLBERG e PALMER, 2013). Adicionalmente, é ressaltado que no CPCNP, a translocação de *ALK* parece definir um subgrupo de pacientes com características clínicas, patológicas e moleculares específicas. A alteração ocorre com maior frequência em indivíduos jovens, do sexo feminino, não-fumantes que apresentam o sub-tipo histológico adenocarcinoma (INAMURA *et al.*, 2009; SHAW *et al.*, 2009). Uma pequena percentagem (menos de 7%) dos pacientes com CPCNP possuem o rearranjo *ALK*. Comparando com a população geral portadora de CPCNP este pequeno grupo distingue o aparecimento da doença em indivíduos jovens, com idade inferior à 50 anos (ZAAROUR *et al.*, 2016).

O gene *PIK3CA* (Phosphatidylinositol 3-kinases) envolvido no crescimento celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência quando mutado também pode induzir há uma transformação celular oncogênica (ZHU *et al.*, 2007). Mutações neste gene são encontradas em apenas 2 a 4% dos casos de CPCNP, com maior frequência no carcinoma escamoso do que no adenocarcinoma (KAWANO *et al.*, 2006). O supressor tumoral *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) também está associado ao CPCNP. Este gene desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular e/ou apoptose, deste modo, alterações genéticas e a perda de expressão deste gene resultam na sobrevivência e continua proliferação celular (HAMMOND *et al.*, 2001). A perda da função de *PTEN* leva à superativação de *Akt*. Sendo assim, a função supressora de *PTEN* é exercida por meio da regulação negativa da via *Akt*, resultando na sobrevivência e continua proliferação celular (HA e KIM, 2014).

2.1.4 Diagnóstico do câncer de pulmão

Segundo o Ministério da Saúde (MS, 2014), de acordo com as diretrizes aprovadas pela Portaria nº 957 de 26 de setembro de 2014, o diagnóstico presuntivo do câncer de pulmão baseia-se na investigação de sintomas respiratórios (tosse, dispneia, dor torácica, hemoptise), fatores constitucionais (fadiga e emagrecimento) ou por achados radiológicos atípicos em exame realizado com outro propósito. No entanto, o diagnóstico definitivo é firmado pelo exame histológico e/ou citológico de espécime tumoral obtido por broncoscopia, mediastinoscopia, biópsia pleural ou biópsia pleuropulmonar a céu aberto ou vídeo-assistida. Ocasionalmente, o diagnóstico poderá ser feito após estudo anatomopatológico de peça cirúrgica (segmento, lobo pulmonar ou pulmão). Também é ressaltado que a citologia de escarro pode ser útil no diagnóstico de tumores de localização central. Além de radiografias de tórax, outros exames de imagem estão disponíveis como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética que geralmente são utilizadas no estadiamento clínico dos pacientes. Outra abordagem diagnóstica recomendada pelo Ministério da Saúde (MS, 2014) é a diferenciação por meio do subtipo histológico e características moleculares. Nos casos de CPCNP é importante diferenciar o carcinoma escamoso do adenocarcinoma, identificando a presença da mutação *EGFR* para fins terapêuticos e prognósticos.

Além dos recursos diagnósticos disponíveis, pesquisas recentes têm investigado novos marcadores para a detecção precoce do câncer de pulmão. Em muitos casos de câncer, as concentrações de certas moléculas tanto no tumor quanto em fluidos corporais sofrem alterações. Essas moléculas podem ser enzimas, proteínas, ácidos nucleicos ou pequenas moléculas que podem ser detectadas em um determinado tipo de câncer e são chamadas de biomarcadores (VAN DER VAART e PRETORIUS, 2010). Esses marcadores podem ser detectados em diversos fluidos biológicos, como no soro, plasma, urina, saliva, sêmen, líquido amniótico entre outros. No caso do câncer de pulmão também podem ser detectados no escarro e no lavado broncoalveolar (ALTINTAS e TOTHILL, 2013). Tem sido salientado que o “biomarcador ideal” deve preencher vários critérios, como, ser acessível por meio de métodos pouco invasivos, de baixo custo para quantificação, específico para a patologia de interesse, indicar sinais antes que a doença apareça e que possam ser úteis no prognóstico e na terapêutica do paciente (ETHERIDGE *et al.*, 2011).

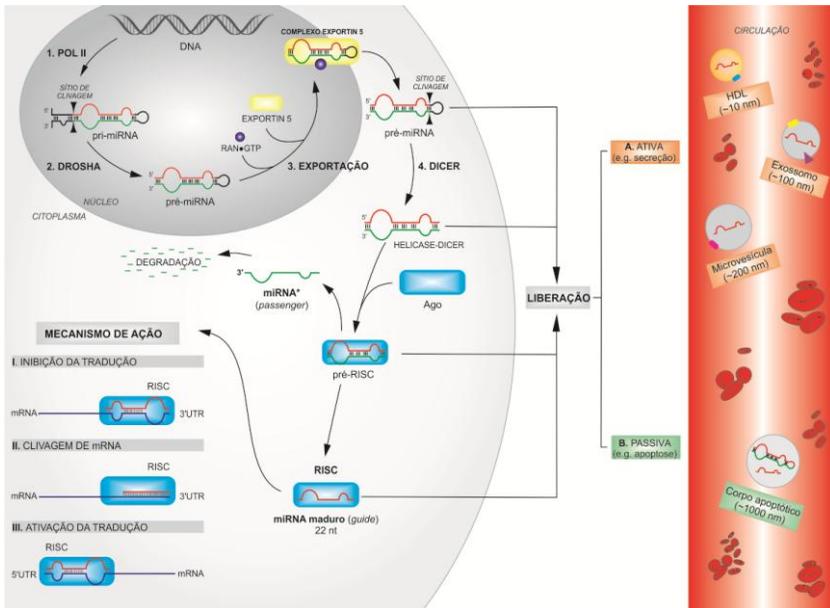
Nos últimos anos, a busca por biomarcadores que sejam aptos em detectar o câncer de pulmão, classificar o tipo histológico, auxiliar no prognóstico ou prever a resposta ao tratamento estão em ascensão. Diversos estudos salientaram que com o diagnóstico em fases iniciais do câncer de pulmão a sobrevivência em cinco anos pode aumentar cerca de 60-70%, contra taxas atuais de 5%, quando o diagnóstico é realizado em estádios avançados da doença (VESCOVO e DENTI, 2015; CRUZ *et al.*, 2016). Neste cenário, os microRNAs (miRNAs) circulantes vêm despertando interesse da comunidade científica como potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos de alguns tipos de câncer, inclusive o de pulmão, uma vez que preenchem vários requisitos para exercer tal função (LU *et al.*, 2005).

2.2 microRNAs (miRNAs)

Os miRNAs são pequenas sequências de RNAs endógenos, não codificantes com aproximadamente 22 nucleotídeos, que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica por intermédio da ligação que ocorre na região não traduzida 3' (3'UTR) do mRNA (RNA mensageiro) (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; AMBROS, 2004). Estão localizados geralmente nos íntrons ou éxons, podem estar isolados ou agrupados e diversos miRNAs podem ser encontrados em uma célula, com uma estimativa de aproximadamente 10.000 moléculas/célula (OSADA e TAKAHASHI, 2007).

A biogênese dos miRNAs envolve várias etapas e pontos regulatórios. Inicialmente, são transcritos pela RNA polimerase II produzindo os miRNAs primários (pri-miRNA) no núcleo da célula (LEE *et al.*, 2004), em seguida, são processados pela enzima RNase III – Drosha para formar o pre-miRNA (precursor do miRNA) de aproximadamente 70 nucleotídeos (HAN *et al.*, 2006). O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pelo fator nuclear de exportação (exportina-5) e processado em aproximadamente 22 nucleotídeos pela enzima RNase III – Dicer em um miRNA de dupla fita (HUTVAGNER *et al.*, 2001; KETTING *et al.*, 2001). Uma das fitas (fita passageira) pode ser degradada e a outra (fita madura) pode ser incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC – composto principalmente por proteínas argonauta), condição em que pode regular a expressão de RNAs mensageiros (HAMMOND *et al.*, 2001; HA e KIM, 2014) Figura 4.

Figura 4 – Biogênese dos miRNAs.



Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase em miRNAs primários e processados pela Drosha ainda no núcleo. O precursor pré-miRNA é exportado para o citoplasma via exportina-5 e em seguida é processado pela Dicer em um miRNA de dupla fita. Uma das fitas é degradada e a outra incorporada ao complexo RISC que pode regular a expressão de RNAs mensageiros por meio da inibição da tradução (ligação do miRNA à região 3'UTR do mRNA por meio do pareamento incompleto de bases); clivagem do mRNA (ligação do miRNA à região 3'UTR do mRNA por meio do pareamento completo de bases); e ativação da tradução (ligação do miRNA à região 5'UTR do mRNA). Os miRNAs podem ser exportados da célula de forma ativa (englobados por microvesículas ou exossomos, outros podem ligar-se a proteínas como a argonauta, ou lipoproteínas como HDL) ou passiva (serem exportados por meio de corpos apoptóticos).

Fonte: Figura adaptada de: DO AMARAL (2018).

Os miRNAs podem ser carreados para a circulação por meio de microvesículas ou exossomos, proteínas (argonauta), lipoproteínas (*high density lipoproteins* – HDL) ou serem exportados por meio da incorporação em corpos apoptóticos (CREEMERS *et al.*, 2012).

Os primeiros miRNAs descobertos foram identificados em um nematódeo da espécie *Caenorhabditis elegans* no ano de 1993 (LEE *et al.*, 1993). Desde então, diversos miRNAs foram descritos. Segundo a base de dados miRBase 2018 versão 22, até o momento foram descritos 2.654 miRNAs maduros na espécie humana. A nomenclatura dos pequenos RNAs para o termo “miRNA” foi estabelecida somente em 2001, e no ano seguinte (2002) com a criação da miRBase, a nomenclatura destes pequenos RNAs foi padronizada. Para nomear um miRNA utiliza-se um prefixo que determina a espécie, para os humanos usa-se “*hsa*” (*homo sapiens*), exemplo, *hsa-miR-21*. O uso de “miR” é para designar se a sequência é madura e “mir” para os pre-miRNAs. Para os miRNAs que originam sequências maduras idênticas é acrescentado mais um hífen e mais um número (exemplo: *hsa-miR-7-1*). Para os casos de genes de miRNAs que expressam sequências não-idênticas, mas muito similares, usa-se o mesmo número e adiciona-se uma letra minúscula (exemplo: *hsa-miR-146a* e *hsa-miR-146b*). E quando dois miRNAs maduros são originados do mesmo pre-miRNA adiciona-se o sufixo -5p ou -3p para indicar a fita correspondente (fita da região 5’ ou 3’) (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006).

O mecanismo biológico e fisiopatológico do modo de ação dos miRNAs ainda não está totalmente esclarecido, sabe-se que estas moléculas são altamente estáveis devido às pequenas dimensões e por resistirem a degradação pelas ribonucleases. Esta grande estabilidade se deve provavelmente ao fato de estarem englobados por microvesículas como os exossomos. Os exossomos são formados dentro das células e em seguida liberados na circulação ao fundirem-se com a membrana plasmática. O fator mais importante é que as células tumorais parecem ser a fonte primária dos exossomos e, portanto, dos miRNAs circulantes. Além disso, estudos revelaram que os miRNAs circulantes também podem estar ligados à proteínas como a argonata, HDL ou serem liberados para a circulação por meio de corpos apoptóticos (VALADI *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2010; ARROYO *et al.*, 2011; CREEMERS *et al.*, 2012).

Os miRNAs controlam várias funções biológicas como a proliferação celular, diferenciação e apoptose (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001) e uma vez desregulados podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias doenças, inclusive do câncer. Estes pequenos RNAs podem atuar como oncogenes (suprimindo genes supressores tumorais) ou supressores tumorais (suprimindo oncogenes) (YANAIHARA *et al.*, 2006). Como exemplo, a superexpressão do *hsa-*

miR-504 em células de linfoma de Burkitt regula negativamente a expressão de p53, e a redução nos níveis deste gene levam a diminuição da apoptose contribuindo para o início e progressão do câncer (HÜ *et al.*, 2010). Por outro lado, a baixa expressão dos miRNAs da família let-7 no CPCNP regula o oncogene *KRAS*, levando a proliferação descontrolada de células e conseqüentemente o câncer (JOHNSON, S. M. *et al.*, 2005). Adicionalmente, sabe-se que a expressão de miRNAs no câncer pode ser específica para cada tipo de tecido, bem como o estágio da doença e alterações clínicas do paciente. Neste contexto, muitos estudos já foram realizados demonstrando que os miRNAs são expressos de forma distinta em condições normais e/ou na presença de doenças (XIE *et al.*, 2010).

Os miRNAs também estão presentes em diversos fluidos biológicos, surgindo como uma nova ferramenta diagnóstica minimamente ou não invasiva para a detecção do câncer (CHEN *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado diferenças na expressão de miRNAs em vários tipos de câncer inclusive no de pulmão, os quais foram comparados com amostras biológicas que não apresentavam malignidade (ZAGRYAZHSKAYA e ZHIVOTOVSKY). Desta forma, além de auxiliar no diagnóstico, os miRNAs podem ser úteis no prognóstico dos pacientes, como exemplo, podem contribuir em casos pós-cirúrgicos para identificar casos suscetíveis à recidiva e direcionar a melhor conduta terapêutica (PATNAIK *et al.*, 2010). Na última década, a análise de miRNAs em amostras de tumores ou em amostras de aspirados citológicos emergiram como prováveis biomarcadores expressivos para o diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento do câncer de pulmão, devido a facilidade de detecção, estabilidade e extrema especificidade. Além disso, miRNAs presentes no soro, plasma, escarro ou sangue total tem sido explorados em um ritmo acelerado por serem biomarcadores menos invasivos na detecção das alterações que levam ao câncer de pulmão (VESCOVO e DENTI, 2015).

A descoberta dos miRNAs abriu um novo campo na área dos diagnósticos moleculares. Os métodos de análises moleculares são ferramentas importantes para compreender o papel dos miRNAs na regulação dos processos biológicos. A abordagem experimental por meio de técnicas para avaliação da expressão gênica enfoca inicialmente o isolamento seguido da detecção dos miRNAs, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) que é uma técnica relativamente simples e apresenta alta sensibilidade (KORBES, 2015). Além disso, para o melhor entendimento da função dos miRNAs é

importante a identificação dos respectivos genes alvo. A função de um miRNA é definida pelos genes que o mesmo regula bem como os efeitos da respectiva expressão (CORRÉA *et al.*, 2015).

A abordagem computacional utiliza algoritmos para realizar a predição de possíveis alvos de um determinado miRNA em bancos de microRNAs. Estas análises podem aumentar o entendimento da função dos miRNAs e conduzir estudos com o intuito de auxiliar na compreensão dos mecanismos da tumorigênese (SONG *et al.*, 2018). Desde a descoberta dos miRNAs vários programas para predição de alvos foram desenvolvidos, como exemplo o Targetscan (www.targetscan.org), Diana-microT (www.microrna.gr/microT-CDS), miRDB (www.mirdb.org). Os programas Targetscan (AGARWAL *et al.*, 2015) e o miRDB (WONG e WANG, 2015) requerem pareamento completo na região *seed* do miRNA com a região 3'UTR do alvo predito, já o programa Diana-microT aceita pareamento parcial nesta região (PARASKEVOPOULOU *et al.*, 2013). A região *seed* é onde ocorre a ligação do miRNA ao mRNA e está localizada entre o segundo e oitavo nucleotídeos da extremidade 5' do miRNA (MOHAMMED *et al.*, 2014). Esta sequência é altamente conservada e considerada a unidade responsável pela especificidade e funcionalidade de um miRNA sobre o respectivo mRNA-alvo (WHEELER *et al.*, 2009). Além disso, o programa Diana-micro-T não restringe as análises às regiões 3'UTR dos transcritos-alvos. A análise também é direcionada para regiões codificantes, como a CDS (regiões codificantes de proteínas) nos casos em que a região 3'UTR é mais curta (< 500nt), hipotetizando que a seleção evolutiva pode reforçar a presença de locais adicionais nesta região codificante quando o espaço é restrito na 3'UTR (RECZKO *et al.*, 2012).

2.2.1 Perfil de miRNAs circulantes associados ao CPCNP

A análise de marcadores moleculares em fluidos biológicos tem sido proposta como uma potente ferramenta para o diagnóstico do câncer (XIE *et al.*, 2010). Como é o caso dos miRNAs, que podem ser úteis para diferenciar pacientes com câncer de pulmão de pacientes saudáveis, de forma minimamente ou não invasiva por meio da expressão destas moléculas nos fluidos biológicos (LORENZI e ZANETTE, 2015). Com base na literatura, foi verificado que diferentes miRNAs circulantes mostraram-se alterados no CPCNP e muitos deles estão associados a um prognóstico ruim.

A superexpressão do *hsa-miR-21* já foi associada ao CPCNP por meio de vários estudos. Este miRNA foi encontrado alterado no soro e plasma de pacientes com CPCNP e associado com a progressão do tumor e a um mau prognóstico (LIU *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2018). O *hsa-miR-21* está bem estabelecido na literatura e tem sido descrito como um *oncomir* (miRNA envolvido na patogênese do câncer expresso em altos níveis) (MARKOU *et al.*, 2016). Foi reportado que o *hsa-miR-21* regula a expressão do supressor tumoral *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) e conseqüentemente ativa o crescimento e invasão no CPCNP (ZHANG *et al.*, 2010). O gene *PDCD4* (*Programmed cell death protein 4*) também foi relatado como alvo do *hsa-miR-21*. Atuando como um supressor tumoral o *PDCD4* está implicado na progressão do câncer por meio do crescimento e invasão do tumor (KETTING *et al.*, 2001).

Outro miRNA relacionado ao CPCNP, o *hsa-miR-20a-5p* é um dos membros do *cluster hsa-miRNA-17-92*. Estes miRNAs encontram-se agrupados e são responsáveis pelo desenvolvimento e homeostase pulmonar (EBI *et al.*, 2009; ROGERS *et al.*, 2015). O *hsa-miR-20a-5p* tem sido relatado com expressão aumentada no plasma de pacientes com CPCNP (ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, um dos genes que possivelmente é regulado pelo *cluster 17-92* é o *PTEN* e quando mutado está relacionado com câncer. Neste sentido, a expressão do *hsa-miR-20a-5p* no CPCNP é inversamente correlacionada com a expressão de *PTEN* (XIAO *et al.*, 2008). O *hsa-miR-24* também foi relacionado com CPCNP demonstrando altos níveis de expressão no soro de pacientes com CPCNP (LE *et al.*, 2012; RECZKO *et al.*, 2012). Surpreendentemente após a remoção cirúrgica dos tumores os níveis de expressão deste miRNA estava significativamente reduzido (LE *et al.*, 2012).

Os miRNAs da família *let-7* desempenham um papel importante no CPCNP. Esta família de miRNAs é composta por 10 membros (*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7i*, *miR-98* and *miR-202*) e uma vez desregulados podem estar associados ao câncer de pulmão (ROUSH e SLACK, 2008). A expressão reduzida destes miRNAs tem sido implicada na patogênese do CPCNP (HAURA *et al.*, 2010). Heegaard e colaboradores (2012) demonstraram que os miRNAs da família *let-7* (*let-7a*, *let-7b*) estavam *downregulated* no soro de 220 pacientes com CPCNP em relação ao grupo controle livre da neoplasia (220 indivíduos). Os miRNAs *let-7* foram os primeiros a serem relatados com a expressão desregulada no câncer de pulmão humano e

associados a uma baixa sobrevida (TAKAMIZAWA *et al.*, 2004). Contudo, um dos genes que os miRNAs let-7 regulam diretamente é o oncogene *KRAS*. As proteínas Ras são associadas à membrana plasmática, ou seja, transmitem informações da membrana celular para o núcleo e são responsáveis por promover o crescimento e a diferenciação celular. Aproximadamente 30% de todos os tumores humanos possuem mutações em *RAS* (ESQUELA-KERSCHER e SLACK, 2006). Neste contexto, a região não traduzida 3'(3'UTR) de *KRAS* contém múltiplos sítios complementares dos miRNAs let-7, estes por sua vez, regulam a expressão do gene. No câncer de pulmão, conforme já relatado os miRNAs let-7 possuem expressão reduzida em comparação à indivíduos livres da neoplasia. E em resposta a expressão reduzida destes miRNAs a expressão do gene *KRAS* é aumentada, levando a proliferação descontrolada de células e consequentemente ao desenvolvimento do câncer (JOHNSON, STEVEN M. *et al.*, 2005).

Outro miRNA associado ao CPCNP é o *hsa-miR-205-5p*, que no estudo de Jiang *et al.*, (2013) apresentou expressão aumentada no soro de indivíduos com CPCNP em comparação aos seguintes grupos: indivíduos saudáveis, sem a neoplasia e pacientes com diagnóstico de doenças pulmonares benignas, como pneumonia, tuberculose, doença pulmonar obstrutiva crônica ou pneumonia intersticial. E de forma surpreendente no estudo de Aushev *et al.* (2013) foi demonstrado que os níveis de expressão plasmáticos do *hsa-miR-205* estavam diminuídos após o tratamento cirúrgico para remoção do tumor em pacientes com CPCNP do tipo carcinoma escamoso. Neste contexto, com base nos estudos relatados o *hsa-miR-205* vem sendo sugerido como potencial biomarcador diagnóstico e prognóstico desta neoplasia. Halvorsen e colaboradores (2016), também verificaram que o *hsa-miR-205* estava alterado no soro de pacientes com câncer de pulmão. Os pacientes selecionados para o estudo eram portadores de CPCNP nos estádios I e II. Com base nas análises realizadas o *hsa-miR-205* estava “*upregulated*” em comparação ao grupo controle (indivíduos saudáveis), e por meio da alta sensibilidade e especificidade foi observado que este miRNA é capaz de detectar a neoplasia em fases iniciais, elevando o potencial de cura e/ou a sobrevida dos pacientes.

O *hsa-miR-125b* também foi relatado com expressão alterada no câncer de pulmão. Foi demonstrado que níveis elevados deste miRNA foram encontrados no soro de pacientes com CPCNP e associados a um prognóstico ruim (YUXIA *et al.*, 2012). Conforme relatado por Le *et al.*, (2009), o *hsa-miR-125b* liga-se a região 3'UTR do mRNA e

reprime a expressão da proteína p53. Estes achados indicam que o *hsa-miR-125b* modula a atividade da p53 reduzindo apoptose, contribuindo para o início e progressão do câncer.

Em outro estudo, Yang e colaboradores (2015) verificaram que os níveis séricos do *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-148b* e o *hsa-miR-152* encontravam-se significativamente diminuídos em pacientes com CPCNP em comparação ao grupo controle (indivíduos saudáveis). As análises indicaram que o baixo nível do *hsa-miR-148a* estava associado a grandes tumores e metástases linfonodais, enquanto que os níveis reduzidos do *hsa-miR-148b* e do *hsa-miR-152* foram correlacionados com o estadio avançado da doença.

Com base no exposto, os miRNAs são biomarcadores promissores para auxiliar no diagnóstico do CPCNP, pois conforme relatos da literatura sabe-se que a expressão diferencial de alguns miRNAs está associada ao desenvolvimento, invasão e metástase desta neoplasia. Além disso, a identificação de miRNAs pode contribuir com a descoberta do CPCNP em fases iniciais, bem como, ser útil no prognóstico dos pacientes, atuando como uma ferramenta robusta e personalizada para orientar a decisão clínica na escolha da melhor abordagem terapêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) e indivíduos controle, e selecionar potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil de expressão de miRNAs nas amostras de soro de pacientes com CPCNP e do grupo controle (indivíduos saudáveis não fumantes) por meio da técnica de microarranjo;
- b) Analisar o perfil de expressão de miRNAs em relação às características clínicas dos pacientes com CPCNP;
- c) Com base na análise de microarranjo selecionar miRNAs diferencialmente expressos para validação por meio da técnica de RT-qPCR;
- d) Analisar os miRNAs selecionados por meio da técnica de RT-qPCR;
- e) Comparar a expressão relativa dos miRNAs nos pacientes com CPCNP em relação aos dois grupos controle (indivíduos saudáveis fumantes e não fumantes);
- f) Comparar a expressão relativa dos miRNAs em relação às características clínicas dos pacientes com CPCNP;
- g) Verificar genes alvos de miRNAs alterados no CPCNP por meio de análise de bioinformática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspecto ético

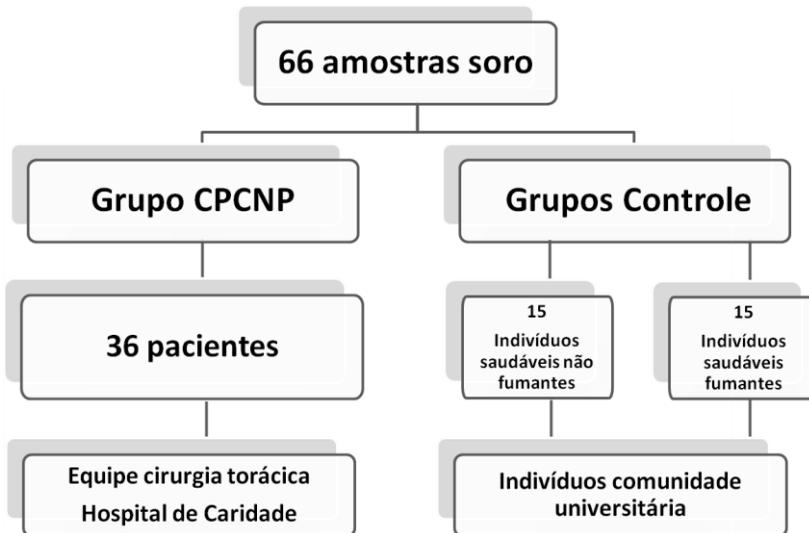
Este estudo foi apreciado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número de parecer 1.231.419. O termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) foi aplicado para todos os participantes desta pesquisa e a coleta foi realizada somente após a assinatura do mesmo. Os dados de todos os participantes foram mantidos em sigilo de acordo com as normas legais.

4.2 Amostras

4.2.1 Aquisição e seleção das amostras

Para a realização deste estudo foram selecionados três grupos amostrais (n = 66): pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (n = 36) e dois grupos controle, indivíduos saudáveis não fumantes (n = 15) e indivíduos saudáveis fumantes (n = 15). As amostras de soro dos casos confirmados de CPCNP foram coletadas sob a responsabilidade da equipe de cirurgia torácica do Imperial Hospital de Caridade, Florianópolis, (SC), no período de setembro de 2014 a junho de 2016. As amostras de soro de todos os pacientes com CPCNP foram coletadas antes de qualquer terapia, como quimioterapia, radioterapia ou cirurgia. As amostras de soro dos grupos controle foram coletadas de indivíduos da comunidade universitária da UFSC no período de fevereiro de 2015 a junho de 2016 (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma representando os grupos amostrais do presente estudo.



4.2.2 Critérios de inclusão da população de estudo

Grupo de pacientes com CPCNP: Foram elegíveis para este estudo pacientes portadores de CPCNP confirmados pela anatomia patológica.

Grupo de indivíduos saudáveis não fumantes: Foram selecionados indivíduos com faixa etária acima de 50 anos.

Grupo de indivíduos saudáveis fumantes: Foram selecionados indivíduos com faixa etária entre 20 e 35 anos.

4.2.3 Critérios de exclusão da população de estudo

Grupo de pacientes com CPCNP: Os pacientes com diagnóstico prévio de câncer de pulmão que foram submetidos a algum tratamento como quimioterapia, radioterapia ou cirurgia não foram alvos deste estudo.

Grupo de indivíduos saudáveis não fumantes: Não foram incluídos neste grupo indivíduos fumantes e portadores de neoplasias ou qualquer outra doença.

Grupo de indivíduos saudáveis fumantes: Não foram incluídos neste grupo indivíduos não fumantes e portadores de neoplasias ou qualquer outra doença.

4.2.4 Coleta e Processamento das amostras

Após assinatura do termo de consentimento pelo participante e/ou responsável legal, o sangue foi coletado, centrifugado por 10 minutos a $820 \times g$ e alíquotas de soro foram devidamente separadas. Após este processo foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Amostras com hemólise não foram incluídas neste estudo, pois podem interferir nos níveis de miRNAs circulantes presentes no soro (KIRSCHNER *et al.*, 2013). Como segunda etapa, as respectivas amostras foram novamente centrifugadas para remoção de fragmentos celulares e crioprecipitados para posterior extração do RNA.

4.3 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *mirVanaTM ParisTM* - AM1556 (Ambion – Life Technologies, Austin, TX, USA), o qual permite a extração de RNA de forma rápida e de alta qualidade. É um sistema constituído por uma fase orgânica e por uma fase de purificação em coluna que contém uma membrana de sílica a qual preserva o RNA total. Este método possibilita a separação de RNAs de alto e baixo peso molecular incluindo os microRNAs (~18-24 nt). Inicialmente, as amostras de soro foram centrifugadas para remoção de fragmentos celulares, crioprecipitados e seguiu-se o protocolo conforme a recomendação do fabricante. Em seguida iniciou-se o processo de extração com 500 μL de soro com adição do mesmo volume de uma solução desnaturante. Após esta etapa foi adicionado o miRNA sintético cel-miR-238 como controle de qualidade para a etapa futura de transcrição reversa. Posteriormente, foi realizada a etapa orgânica para separação do RNA seguida das etapas de lavagem na coluna de purificação. Ao finalizar o processo o RNA total foi eluído em água livre de RNase (tratada com DEPC – Sigma Aldrich Brasil Ltda, São

Paulo, Brasil) e estocado à uma temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização.

4.4 Quantificação do RNA total

Após a etapa de extração, utilizou-se o espectrofotômetro NanoVue Plus[®] (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) para avaliar a quantidade do RNA total. Esta determinação permite utilizar um baixo volume de amostra ($2\text{ }\mu\text{L}$) e foi realizada por meio de leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm. Com relação à quantificação, salienta-se que o pico de absorbância do RNA ocorre em 260 nm e uma leitura igual a 1 nesta absorbância equivale a $40\text{ }\mu\text{g}$ de RNA/mL.

4.5 Integridade do RNA total

Para avaliação da integridade do RNA total utilizou-se o *Agilent RNA 6000 Pico kit* (5067-1513, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) no equipamento *2100 Bioanalyzer* (G2947CA, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Inicialmente, os componentes do kit a serem utilizados foram deixados em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida realizou-se o procedimento conforme protocolo preconizado pelo fabricante. Após a adição dos reagentes do kit e das amostras no *chip RNA 6000 Pico*, o mesmo foi inserido no equipamento *Bioanalyzer* para a leitura. Ao término da corrida eletroforética os resultados foram obtidos por meio do *Software Agilent 2100 Expert*. É um bom método de escolha, pois apresenta alta sensibilidade com baixos limites de detecção para RNA ($50\text{-}5000\text{ pg}/\mu\text{L}$), utiliza apenas $1\text{ }\mu\text{L}$ de amostra e a corrida eletroforética ocorre em 30 minutos.

4.6 Análise de Microarranjo

A análise do perfil de expressão dos miRNAs foi realizada por meio da técnica de microarranjo. Para isto, foram utilizadas lâminas de vidro *G3 Human miRNA Microarray, Release 21* (G4870C, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) com capacidade de análise para 8 amostras, contendo 2.549 sequências de miRNAs e 21 controles internos. O protocolo foi seguido conforme instruções recomendadas pelo fabricante. Inicialmente, as amostras de RNA total ($30\text{ }\mu\text{L}$) que

estavam armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram submetidas ao processo de concentração no equipamento *SpeedVacTM Concentrator Savant (SPD1010, ThermoFisher Scientific)* e ao finalizar o processo foi adicionado água livre de RNase. Após esta etapa iniciou-se o processo de marcação das amostras com a diluição do *Spike-In*, seguido da preparação do *CIP (Calf Intestinal Phosphatase) Master Mix* que continha: $10\times$ *Calf Intestinal Phosphatase Buffer*, a terceira diluição do *Spike-In* e *Calf Intestinal Phosphatase*, o qual foi adicionado às amostras para posterior defosforilação em termobloco. Em seguida foi adicionado DMSO para a desnaturação das amostras, as quais foram incubadas e mantidas em um banho de gelo e água. A próxima etapa envolveu o processo de ligação das amostras, seguido da preparação do *Ligation Master Mix*, que continha: $10 \times$ *T4 RNA Ligase Buffer*, *Cyanine 3-pCp* e *T4 RNA Ligase*. Após adição do mix, as amostras foram incubadas, em seguida submetidas ao *SpeedVacTM Concentrator* até a completa secagem para remoção de resíduos de DMSO e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O passo seguinte foi estabelecido pelo processo de hibridização. As amostras foram resuspensas em água livre de RNase e foi adicionado o *Hybridization Mix* que continha: *Hyb Spike-In solution*, $10 \times$ *Gene Expression Blocking Agent* e o $2 \times$ *Hi-RPM Hybridization Buffer*. Após o período de incubação e banho de gelo, a câmara com as amostras pipetadas na lâmina foi montada e levada imediatamente para o forno de hibridização a uma temperatura de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, com rotação de 20 rpm por 20 h . Ao finalizar a etapa de hibridização, iniciou-se o processo de lavagem da lâmina de microarranjo. Foram utilizados dois tampões de forma ordenada, o *GE Wash Buffer1* seguido do *GE Wash Buffer2*. Em seguida, a lâmina foi inserida no equipamento *SureScan Microarray Scanner (G4900DA, Agilent Technologies, Califórnia, EUA)* para o processo de leitura. Os dados foram adquiridos por meio do *Feature Extraction Software (G4460-90053 - Agilent Technologies, California, EUA)* para posterior análise dos miRNAs no *Genepring (G5886AA- Agilent Technologies, Califórnia, EUA)*. Após esta etapa, alguns miRNAs diferencialmente expressos foram selecionados para validação por meio da técnica de RT-qPCR.

4.7 Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

As reações de poliadenilação e transcrição reversa (RT) foram realizadas utilizando o kit *1st-Strand cDNA Synthesis* (600036, *Agilent Technologies, California, USA*). Para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi utilizado o kit *miRNA QPCR Master Mix* (600583, *Agilent Technologies, California, USA*). Inicialmente 30 μL do RNA total foi concentrado no equipamento *Speed VacTM Concentrator* por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida o RNA total liofilizado foi ressuspenso em 14 μL de água livre de RNase e a reação de poliadenilação foi realizada conforme as instruções do fabricante, utilizando o termociclador *VeritiTM* (*Applied Biosystems, Califórnia, EUA*). Em seguida, para a síntese de cDNA utilizou-se 4 μL do RNA poliadenilado e o protocolo foi seguido conforme preconizado pelo fabricante, e as amostras foram novamente incubadas no termociclador. Após estas etapas, as amostras de cDNA foram mantidas em temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da reação de qPCR. A reação de qPCR foi realizada utilizando 1 μL de cDNA (diluição 1:6) seguindo a recomendação do protocolo estabelecido pelo fabricante. Para esta reação utilizou-se o termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Califórnia, EUA*) com a seguinte programação: 40 ciclos de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 s (desnaturação), temperatura de anelamento por 15 s (anelamento) e $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s (extensão). Por fim, foi realizada uma curva de dissociação a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min; temperatura de anelamento por 30 s e $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min. Os níveis de expressão dos miRNAs foram calculados pelo *comparative cycle threshold (C_t)* utilizando o *SDS 2.4* software (*Applied Biosystems, Califórnia, EUA*) e foi considerado $C_t \leq 35$. Os valores de C_t dos miRNAs alvos foram normalizados em relação ao controle endógeno *hsa-miR-1273g-3p* e a expressão relativa foi determinada pela equação $2^{(-\Delta C_t)}$ conforme previamente descrito por Livak e Schmittgen (2001). A eficiência das reações de qPCR foram determinadas utilizando o *LinRegPCR software*, versão 2015.4.

4.8 Primers utilizados na reação de qPCR

Para a realização das reações de qPCR os seguintes *primers* foram desenhados, *hsa-miR-1273g-3p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*,

hsa-miR-6807-5p, hsa-miR-6867-5p, os quais podem ser visualizados no quadro Quadro 3 juntamente com a sequência específica de cada um.

Quadro 3 – *Primers* utilizados na reação de qPCR.

Primers	Sequências 5´- 3´
<i>hsa-miR-1273g-3p</i>	CACGCACTCCAGCCTGAG
<i>hsa-miR-16-5p</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG
<i>hsa-miR-21-5p</i>	GTAGCTTATCAGACTGATGTTGA
<i>hsa-miR-24-3p</i>	GCTCAGTTCAGCAGGAACAG
<i>hsa-miR-572</i>	GCTCGGCGGTGGCCCA
<i>hsa-miR-5006-5p</i>	CCAGGGCAGGAGGTGGAA
<i>hsa-miR-6807-5p</i>	AGCCAGTGGAATGGAGAGG
<i>hsa-miR-6867-5p</i>	TGTGTGTGTAGAGGAAGAAGGGA

Os *primers* para a análise dos níveis de expressão de todos os miRNAs utilizados neste estudo foram desenhados seguindo o guia on line que está disponível em: www.genomics.agilent.com/files/LitItems/miRNA_primer_design_guidelines.pdf., conforme recomendação preconizada pelo protocolo do kit Agilent (600583, *Agilent Technologies, Califórnia, EUA*).

4.9 Análise de bioinformática

A análise de bioinformática do presente estudo foi realizada em colaboração com o doutorando da Universidade de Trento, Itália, Simone Detassis no período de estágio no Brasil. Para a realização desta análise dois miRNAs foram selecionados, o *hsa-miR-5006-5p* e o *hsa-miR-6807-5p*. Os alvos preditos para ambos os miRNAs foram gerados por meio dos programas de predição de alvos miRDB (WONG e WANG, 2015), TargetScan (versão 7.2) (AGARWAL *et al.*, 2015) e DIANA (versão 5.0) (PARASKEVOPOULOU *et al.*, 2013). Os genes

alvos em comum nas três bases de dados foram analisados nos programas GeneOntology e GeneXplain (versão 4.9). A mesma análise foi realizada com os genes alvos validados adquiridos na base de dados TarBase.

4.10 Análise estatística

A análise de normalidade dos dados foi realizada utilizando o teste de *Shapiro-Wilk* por meio do *software GraphPad Prism 5.0*. (California, EUA). A análise de expressão dos miRNAs alterados na técnica de microarranjo foi realizada com o auxílio do *software Genespring GX (G5886AA- Agilent Technologies, California, EUA)* utilizando o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* com correção de *Westfall-Young* ou sem correção, considerando miRNAs detectados em pelo menos 70% das amostras, *Fold Change (FC)* ≥ 2 e valores de $p \leq 0,05$. As análises estatísticas dos resultados da técnica de RT-qPCR e curva *ROC* foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5.0*. (California, EUA). As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney U*, considerando valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Voluntariamente participaram deste estudo 66 indivíduos, divididos em três grupos amostrais. O estudo foi dividido em duas etapas, análise de microarranjo que compreendeu a avaliação de miRNAs no soro de pacientes com CPCNP em comparação ao grupo controle (Indivíduos saudáveis não fumantes), bem como a validação destes resultados por RT-qPCR no soro de pacientes com CPCNP e dos grupos controle (indivíduos saudáveis não fumantes e indivíduos saudáveis fumantes).

5.1 Identificação de miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes com CPCNP por meio da técnica de microarranjo

5.1.1 Características dos indivíduos participantes da análise de microarranjo

Participaram desta etapa 34 indivíduos, incluindo 21 pacientes com CPCNP e 13 indivíduos saudáveis não fumantes como controle, com média de idade de 63,5 e 55,1 anos, respectivamente (variando de 52 a 80 e 50 a 61 anos, respectivamente). O grupo dos pacientes foi composto por seis indivíduos do sexo feminino e por 15 do masculino, e o grupo controle por nove indivíduos do sexo feminino e por quatro do masculino. Entre os pacientes com CPCNP cinco indivíduos apresentaram o subtipo histológico carcinoma escamoso (CE), enquanto que 16 indivíduos foram diagnosticados com adenocarcinoma (AD), cujos casos estavam distribuídos em diferentes estádios da doença. Baseado na classificação TNM os estádios I e II foram considerados iniciais, os quais referem-se aos pacientes passíveis ao tratamento cirúrgico. Os estádios III e IV foram considerados como avançados, os quais referem-se aos pacientes com neoplasia localmente avançada e metástases à distância. Sendo assim, foi possível observar que aproximadamente 29% dos pacientes encontravam-se nas fases iniciais, ao passo que 71% estavam em fases tardias da doença. Nesta etapa, os

fumantes representaram o maior grupo totalizando 15 pacientes em comparação aos ex-fumantes (05) e não fumantes (01) Tabela 3. As características detalhadas de cada participante desta fase da pesquisa podem ser visualizadas nos Apêndices A (pacientes 1 ao 21) e B (Pacientes 1 ao 13).

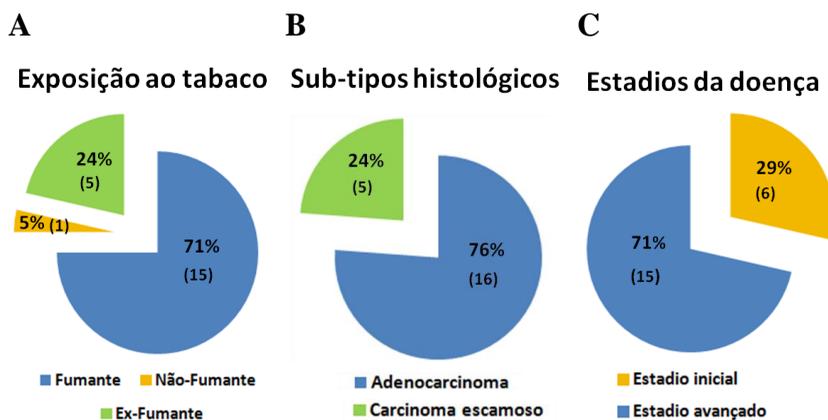
Tabela 3 – Características dos grupos utilizados na análise de microarranjo.

	Pacientes com CPCNP (n = 21)	Controle (Indivíduos saudáveis não fumantes) (n = 13)
Idade (anos), média ± DP	63,5 ± 8,9	55,1 ± 3,2
Sexo, n (%)		
Feminino	6 (28,5)	9 (69,2)
Masculino	15 (71,5)	4 (30,8)
Exposição ao tabaco, n (%)		
Fumantes	15 (71,5)	
Não fumantes	1 (4,7)	
Ex-fumantes	5 (23,8)	
Fumantes Passivos	0	
Estadio TNM		
I	4 (19,1)	
II	2 (9,5)	
III	7 (33,3)	
IV	8 (38,1)	
Subtipos histológicos		
AD	16 (76,2)	
CE	5 (23,8)	

AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma escamoso, CPCNP, câncer de pulmão de células não pequenas; DP, desvio padrão.

Para melhor visualização, a Figura 6 mostra as características dos pacientes com CPCNP participantes da etapa de microarranjo em relação ao subtipo histológico, estadios da doença e exposição ao tabaco.

Figura 6 - Características dos pacientes com CPCNP participantes da etapa de microarranjo. (A) Porcentagem de casos relacionados à exposição ao tabaco; (B) Porcentagem de casos relacionados ao sub-tipo histológico; (C) Porcentagem de casos relacionados aos estadios da doença.

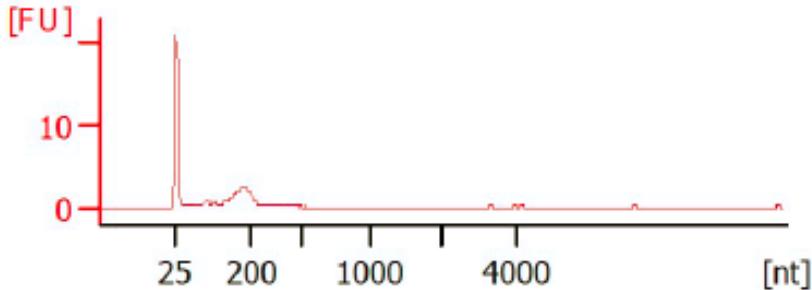


5.1.2 Análise da integridade do RNA total

As amostras de RNA total foram submetidas ao teste de integridade, realizado por meio da técnica de eletroforese microfluídica utilizando o equipamento *Bioanalyzer*. Na Figura 7 é possível observar um eletroferograma de umas das amostras de RNA total deste estudo. O pico dos pequenos RNAs encontra-se na região entre 25 a 200 nucleotídeos (nt). Os eletroferogramas de todas as amostras deste estudo seguiram o mesmo perfil da Figura 7 e podem ser visualizados no Apêndice C. Importante salientar que nas análises de integridade que empregam RNA de amostras como soro ou plasma os picos de RNA ribossomal (rRNA) 18S e 28S estão ausentes, como pode ser observado neste caso. Os picos de RNA ribossomal aparecem na região entre 2000 e 4000 nt, ausentes no caso. Segundo dados da literatura, a presença de altos picos ribossomais em análises com soro ou plasma normalmente indica contaminação por células ou debris (QIAGEN, 2017; SIGMA-

ALDRICH, 2017). Com base nestes resultados é possível assegurar que as amostras de RNA total estão íntegras e com qualidade suficiente para a etapa seguinte, avaliação de miRNAs por microarranjo.

Figura 7 – Eletroferograma (amostra P13).

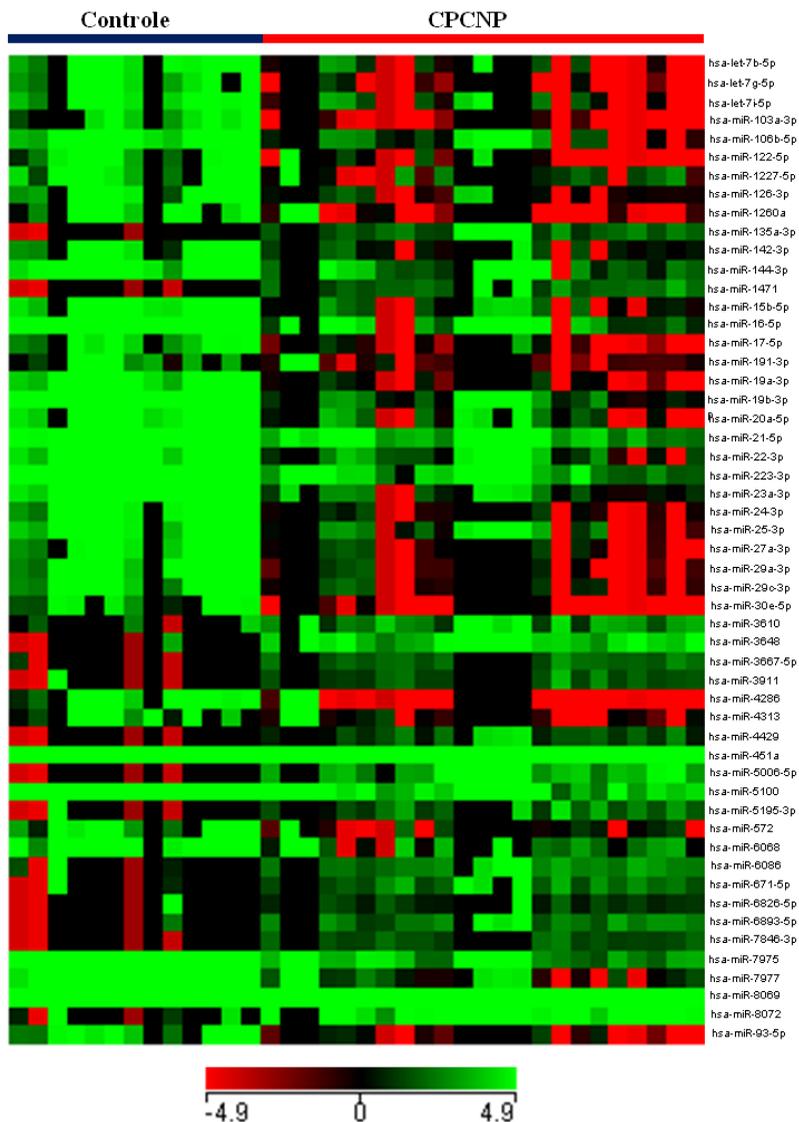


FU: unidade de fluorescência; [nt]: nucleotídeo; P: paciente.

5.1.3 miRNAs diferencialmente expressos no CPCNP em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis não fumantes)

Neste estudo, as análises de microarranjo foram realizadas mediante uso de lâminas *Release 21* provenientes da plataforma Agilent (*Agilent Technologies, Califórnia, EUA*). Conforme mencionado, foram avaliadas 21 amostras de pacientes com CPCNP bem como 13 amostras controle de indivíduos saudáveis não fumantes. Após a obtenção dos resultados, os dados foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e verificou-se que as amostras não apresentaram distribuição normal. Sendo assim, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* com correção de *Westfall-Young* ou sem correção, considerando um valor de $p \leq 0,05$ e *Fold Change* ≥ 2 . Baseando-se nisso, a análise inicial foi realizada comparando o perfil de expressão dos miRNAs entre os pacientes com CPCNP e os indivíduos do grupo controle por meio do teste de *Mann-Whitney* com correção de *Westfall-Young*, ($p \leq 0,05$ e $FC \geq 2$). A Figura 8 mostra a matriz de expressão com os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP em relação ao grupo controle.

Figura 8 – Matriz de expressão dos 53 miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com CPCNP em comparação ao grupo controle.



A cor verde indica alta intensidade, a preta intensidade média e a vermelha baixa intensidade de expressão. CPCNP, câncer de pulmão de células não pequenas. Controle, grupo de indivíduos saudáveis não fumantes.

Os quadrados da matriz representam as amostras e as cores representam o grau de intensidade da expressão. Neste sentido, a cor verde indica alta intensidade, a preta intensidade média e a vermelha baixa intensidade de expressão. Com base na matriz foi observado que grande parte dos miRNAs estão subexpressos nos pacientes com CPCNP quando comparados aos indivíduos do grupo controle (Figura 8).

Para complementar a Figura 8, a Tabela 4, mostra os 53 miRNAs alterados, valor de p , FC e regulação. Nesta análise, 15 miRNAs estavam com expressão aumentada (*upregulated*), enquanto que 38 miRNAs estavam com expressão diminuída (*downregulated*). Os valores de FC variaram de 3 a 149 e os valores de p ficaram entre $< 0,0001$ e $0,0303$. Os miRNAs *hsa-let-7b-5p*, *hsa-let-7g-5p*, *hsa-let-7i-5p*, *hsa-miR-103a-3p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-122-5p*, *hsa-miR-1260a*, *hsa-miR-15b-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-17-5p*, *hsa-miR-19a-3p*, *hsa-miR-19b-3p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-23a-3p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-27a-3p*, *hsa-miR-29a-3p* e *hsa-miR-30e-5p*, *hsa-miR-3648*, *hsa-miR-4286*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-7975* e *hsa-miR-7977* apresentaram valores de FC que variaram de 30 a 149 e valor de $p < 0,0001$, mostrando uma diferença extremamente significativa quando comparados ao grupo controle.

Tabela 4 – miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com CPCNP em relação ao grupo controle.

miRNA	Valor-p	FC	Regulação
<i>hsa-let-7b-5p</i>	$<0,0001$	45	<i>Down</i>
<i>hsa-let-7g-5p</i>	$<0,0001$	75	<i>Down</i>
<i>hsa-let-7i-5p</i>	$<0,0001$	32	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-103a-3p</i>	$<0,0001$	63	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	$<0,0001$	30	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-122-5p</i>	$<0,0001$	64	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-1227-5p</i>	0,0202	25	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-126-3p</i>	$<0,0001$	23	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-1260a</i>	$<0,0001$	51	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-135a-3p</i>	$<0,0001$	9	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-142-3p</i>	$<0,0001$	16	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-144-3p</i>	$<0,0001$	21	<i>Down</i>

Continuação da Tabela 4

<i>hsa-miR-1471</i>	<0,0001	9	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-15b-5p</i>	<0,0001	41	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-16-5p</i>	<0,0001	90	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-17-5p</i>	<0,0001	49	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-191-3p</i>	0,0202	10	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-19a-3p</i>	<0,0001	144	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-19b-3p</i>	<0,0001	45	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	<0,0001	44	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-21-5p</i>	0,0202	7	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-22-3p</i>	<0,0001	26	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-223-3p</i>	<0,0001	27	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-23a-3p</i>	<0,0001	30	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-24-3p</i>	<0,0001	62	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-25-3p</i>	<0,0001	25	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-27a-3p</i>	<0,0001	38	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	<0,0001	58	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-29c-3p</i>	<0,0001	47	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-30e-5p</i>	<0,0001	70	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-3610</i>	<0,0001	7	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-3648</i>	<0,0001	35	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-3667-5p</i>	<0,0001	5	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-3911</i>	0,0303	4	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-4286</i>	<0,0001	144	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4313</i>	0,0303	12	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4429</i>	<0,0001	6	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-451a</i>	<0,0001	10	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-5006-5p</i>	<0,0001	27	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-5100</i>	0,0202	11	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-5195-3p</i>	0,0202	5	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-572</i>	<0,0001	34	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-6068</i>	0,0202	27	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-6086</i>	0,0202	6	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-671-5p</i>	<0,0001	6	<i>Up</i>

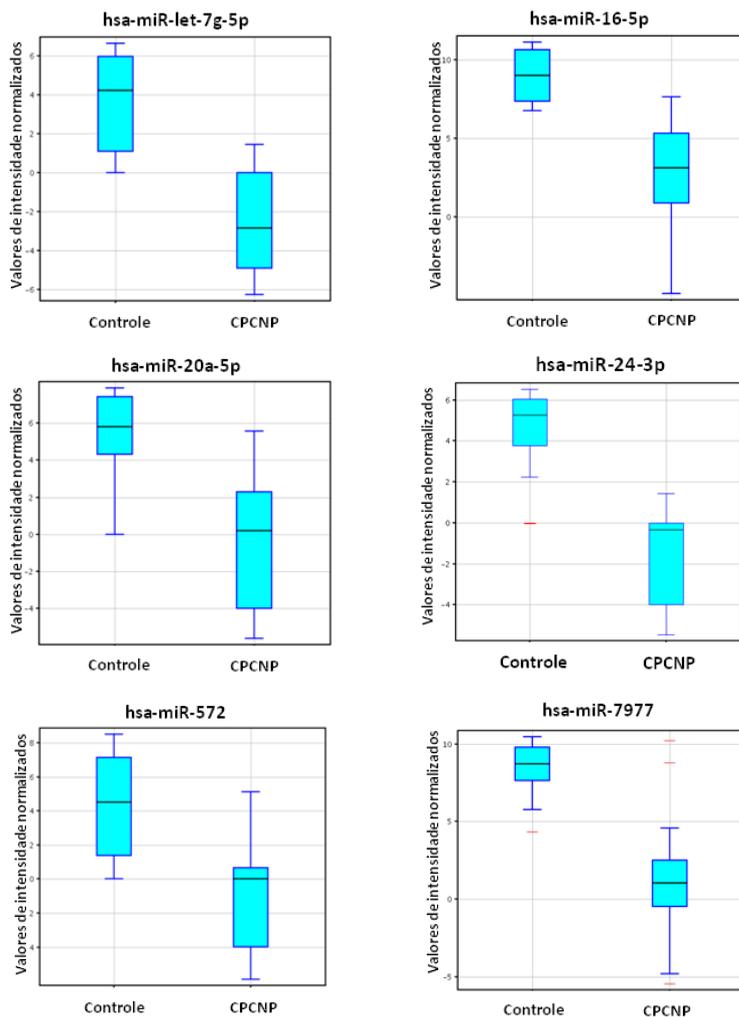
Continuação da Tabela 4

<i>hsa-miR-6826-5p</i>	0,0202	3	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-6893-5p</i>	<0,0001	8	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-7846-3p</i>	<0,0001	5	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-7975</i>	<0,0001	42	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-7977</i>	<0,0001	149	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-8069</i>	<0,0001	9	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-8072</i>	<0,0001	32	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-93-5p</i>	<0,0001	39	<i>Down</i>

FC, *Fold Change*; up, *upregulated*; down, *downregulated*.

Para observação da intensidade de expressão, a Figura 9 mostra os gráficos *box plot* de alguns dos principais miRNAs encontrados alterados com elevada significância no CPCNP. Por meio da mediana observa-se que a expressão destes miRNAs (*let-7g-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-7977*) estava reduzida no soro de pacientes com CPCNP quando comparados aos indivíduos do grupo controle.

Figura 9 – Gráficos *box plot* de seis miRNAs alterados que apresentaram elevada significância na comparação de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) em relação ao grupo controle.



5.1.4 miRNAs diferencialmente expressos em relação aos subtipos histológicos

Além da comparação inicial, o grupo de pacientes com CPCNP foi estratificado com base nas características dos pacientes. E com o intuito de encontrar miRNAs que pudessem diferenciar os subtipos histológicos, AD de CE realizou-se a análise estatística utilizando o teste *Mann-Whitney* (sem correção; $p \leq 0,05$ e $FC \geq 2$). Nesta análise quatro miRNAs foram diferencialmente expressos, com valores de p entre 0,0318 e 0,0389, e valores de FC semelhantes, variando de 2 a 3 (Tabela 5).

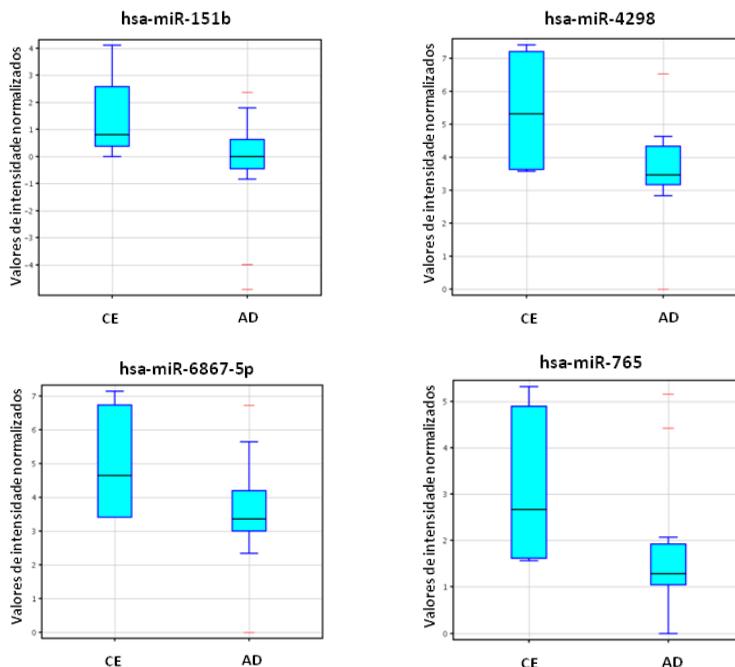
Tabela 5 – miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com adenocarcinoma em relação aos pacientes com carcinoma escamoso.

miRNA	Valor - p	FC	Regulação
<i>hsa-miR-151b</i>	0,0346	3	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4298</i>	0,0389	3	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-6867-5p</i>	0,0389	3	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-765</i>	0,0318	2	<i>Down</i>

FC: *Fold Change*; down: *downregulated*.

Para melhor visualização da intensidade de expressão a Figura 10 apresenta os gráficos *box plot*. É possível observar que o subtipo histológico adenocarcinoma diferencia do carcinoma escamoso apresentado uma expressão reduzida em todos os miRNAs alterados.

Figura 10 – Gráficos *box plot* dos miRNAs diferencialmente expressos da comparação entre adenocarcinoma (AD) e carcinoma escamoso (CE) nos pacientes com CPCNP.



Em seguida, realizou-se a análise estatística para comparação dos estadios (inicial × avançado) nos pacientes com CPCNP, mas não houve significância, ou seja, nenhum miRNA mostrou-se diferencialmente expresso.

5.1.5 miRNAs diferencialmente expressos em relação ao adenocarcinoma nos estadios inicial e avançado

Como os casos de Adenocarcinoma são os mais frequentes no CPCNP, bem como contemplam o maior número de casos deste estudo, foi realizada a análise dos pacientes portadores de adenocarcinoma em relação aos estadios da doença (inicial e avançado) utilizando o teste *Mann-Whitney* (sem correção, $p \leq 0,05$ e $FC \geq 2$). Os resultados são apresentados na Tabela 6.

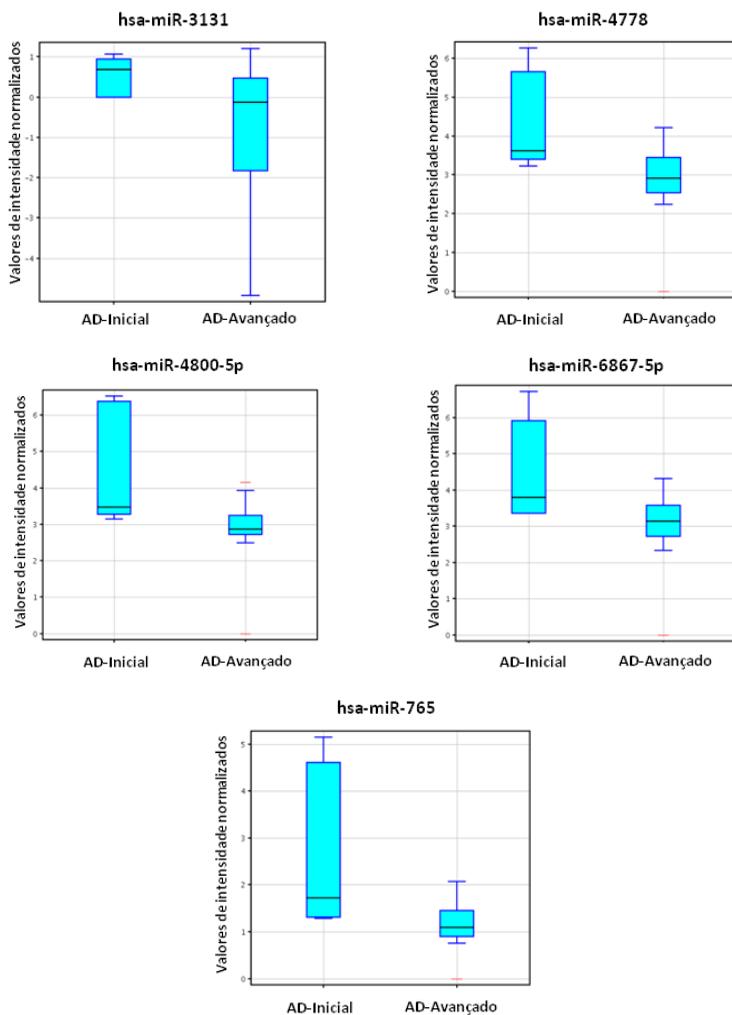
Tabela 6 – miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com adenocarcinoma no estadio inicial em relação ao estadio avançado.

mirNA	Valor-p	FC	Regulação
<i>hsa-miR-3131</i>	0,0387	2	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4778-5p</i>	0,0170	3	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4800-5p</i>	0,0170	3	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-6867-5p</i>	0,0170	3	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-765</i>	0,0170	2	<i>Down</i>

FC: *Fold Change*; down: *downregulated*.

Observa-se que cinco miRNAs foram diferencialmente expressos. Estes apresentaram valores similares de FC (variando de 2 a 3) com valores de *p* entre 0,0170 e 0,0387. A Figura 11 mostra mais claramente a intensidade de expressão. Nota-se que todos os miRNAs alterados apresentaram o mesmo perfil, e ao passo que o paciente com adenocarcinoma atinge um estadio avançado a expressão diminui.

Figura 11 – Gráficos *box plot* dos miRNAs alterados nos pacientes com adenocarcinoma no estadio inicial em relação ao estadio avançado.



AD-inicial: Adenocarcinoma estadio inicial;

AD-avanzado: Adenocarcinoma estadio avanzado.

5.1.6 miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP fumantes em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis não fumantes)

Em seguida, foi realizada a análise de comparação dos pacientes com CPCNP fumantes em relação aos indivíduos do grupo controle utilizando o teste *Mann-Whitney* com correção de *Westfall-Young* ($p \leq 0,05$ e $FC \geq 2$). A Tabela 7 mostra os miRNAs diferencialmente expressos nesta análise.

Tabela 7 – miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP fumantes em relação aos indivíduos não fumantes (controle).

miRNA	Valor- <i>p</i>	FC	Regulação
<i>hsa-let-7b-5p</i>	<0,0001	49	<i>Down</i>
<i>hsa-let-7g-5p</i>	<0,0001	105	<i>Down</i>
<i>hsa-let-7i-5p</i>	0,0202	29	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-103a-3p</i>	<0,0001	62	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	<0,0001	32	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-122-5p</i>	<0,0001	80	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-1236-5p</i>	0,0202	3	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-126-3p</i>	0,0202	20	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-1260a</i>	<0,0001	55	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-135a-3p</i>	<0,0001	9	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-142-3p</i>	<0,0001	20	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-144-3p</i>	<0,0001	26	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-1471</i>	<0,0001	8	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-15b-5p</i>	<0,0001	44	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-16-5p</i>	<0,0001	63	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-17-5p</i>	<0,0001	65	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-191-3p</i>	0,0202	10	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-19a-3p</i>	<0,0001	146	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-19b-3p</i>	<0,0001	44	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	<0,0001	44	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-22-3p</i>	<0,0001	30	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-223-3p</i>	<0,0001	26	<i>Down</i>

Continuação da Tabela 7

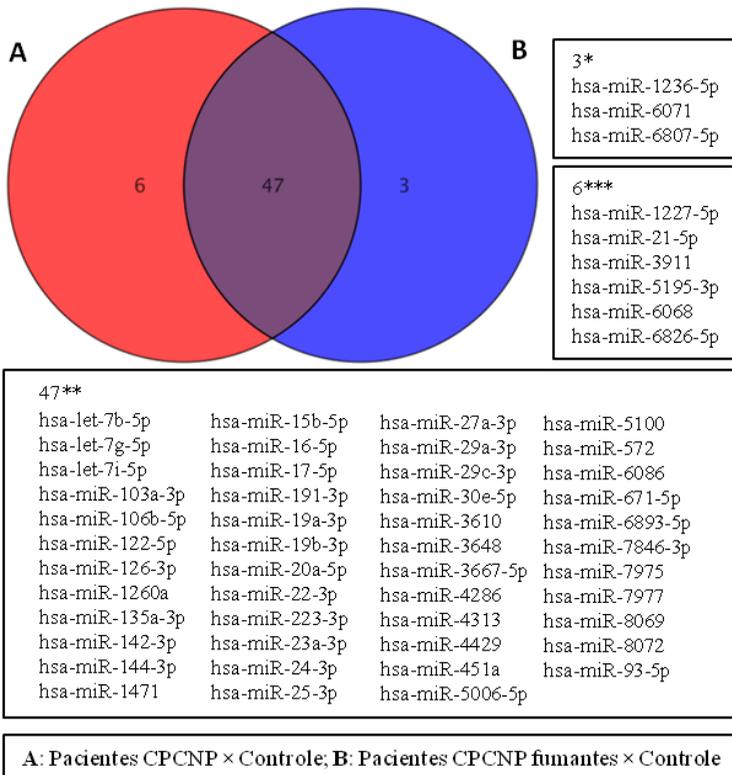
<i>hsa-miR-23a-3p</i>	<0,0001	22	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-24-3p</i>	<0,0001	51	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-25-3p</i>	0,0202	25	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-27a-3p</i>	<0,0001	35	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	<0,0001	57	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-29c-3p</i>	<0,0001	42	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-30e-5p</i>	<0,0001	72	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-3610</i>	0,0202	6	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-3648</i>	<0,0001	34	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-3667-5p</i>	<0,0001	5	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-4286</i>	<0,0001	147	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4313</i>	0,0202	17	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-4429</i>	<0,0001	7	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-451a</i>	0,0202	11	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-5006-5p</i>	<0,0001	34	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-5100</i>	0,0404	13	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-572</i>	0,0202	20	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-6071</i>	0,0202	4	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-6086</i>	0,0202	6	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-671-5p</i>	0,0202	6	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-6807-5p</i>	<0,0001	6	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-6893-5p</i>	<0,0001	8	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-7846-3p</i>	<0,0001	5	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-7975</i>	<0,0001	49	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-7977</i>	<0,0001	226	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-8069</i>	0,0202	10	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-8072</i>	<0,0001	41	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-93-5p</i>	<0,0001	38	<i>Down</i>

FC: *Fold Change*; up: *upregulated*; down: *downregulated*

Diante da Tabela 7 observa-se que 50 miRNAs estavam alterados, 15 *upregulated* e 35 *downregulated*, com valores de FC entre 3 e 226 e valores de *p* que variam de <0,0001 a 0,0404.

Com o intuito de avaliarmos a existência de relações entre os miRNAs diferencialmente expressos nas comparações Pacientes CPCNP × Controle e Pacientes CPCNP fumantes × Controle foi elaborado o diagrama de Venn, o qual permite a sobreposição dos resultados analisados. A Figura 12 mostra os miRNAs diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$ e $FC \geq 2$) especificamente em cada comparação (A: Pacientes CPCNP × Controle e B: Pacientes CPCNP Fumantes × Controle), bem como os miRNAs que estão em comum nas duas comparações (A e B).

Figura 12 – Diagrama de Venn dos miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com CPCNP e nos pacientes CPCNP fumantes em relação ao controle.



CPCNP: Câncer de pulmão de células não pequenas.

Neste sentido, observa-se que os miRNAs *hsa-miR-1227-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-3911*, *hsa-miR-5195-3p*, *hsa-miR-6068* e *hsa-miR-6826* estavam alterados exclusivamente nos pacientes com CPCNP quando comparados com o grupo controle (comparação A) e os miRNAs *hsa-miR-1236-5p*, *miR-6071* e *hsa-miR-6807-5p* estavam diferencialmente expressos apenas quando os pacientes CPCNP fumantes foram comparados ao grupo controle (comparação B), enquanto que 47 miRNAs estavam alterados em comum para ambas as comparações (A e B).

5.1.7 miRNAs selecionados para etapa de validação por RT-qPCR

Com base nos resultados da análise de microarranjo (detecção dos miRNAs nas amostras) juntamente aos relatos da literatura, oito miRNAs foram selecionados para a etapa de validação pelo método de RT-qPCR. Deste modo, foram elencados os seguintes miRNAs, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e *hsa-miR-6867-5p*, considerando $FC \geq 2$ e $p \leq 0,05$. Por meio da Tabela 8 é possível observar as comparações em que os respectivos miRNAs foram capazes de diferenciar um grupo do outro, bem como valor de p , FC e regulação. Entre os miRNAs selecionados os miRNAs *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572* e *hsa-miR-6867-5p* apresentaram regulação *down*, enquanto que o *hsa-miR-5006-5p* e o *hsa-miR-6807* apresentaram regulação *up*. Os valores de FC ficaram entre 3 a 90 e os valores de p variaram de $< 0,0001$ e $0,0170$.

Para melhor visualização, o diagrama de Venn mostra os miRNAs selecionados nos quatro grupos analisados. Conforme observado na Figura 13 (comparações A e B) os miRNAs *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572* e o *hsa-miR-5006-5p* diferenciaram os pacientes com CPCNP e pacientes fumantes com CPCNP do grupo controle (indivíduos saudáveis não fumantes). Entretanto, o *hsa-miR-21-5p* estava exclusivamente alterado na comparação de pacientes com CPCNP em relação ao grupo controle (comparação A), e da mesma maneira, o *hsa-miR-6807-5p* estava significativamente expresso somente nos pacientes fumantes com CPCNP quando comparados com o grupo controle (comparação B). No entanto, o *hsa-miR-6867-5p* foi diferencialmente expresso nas seguintes

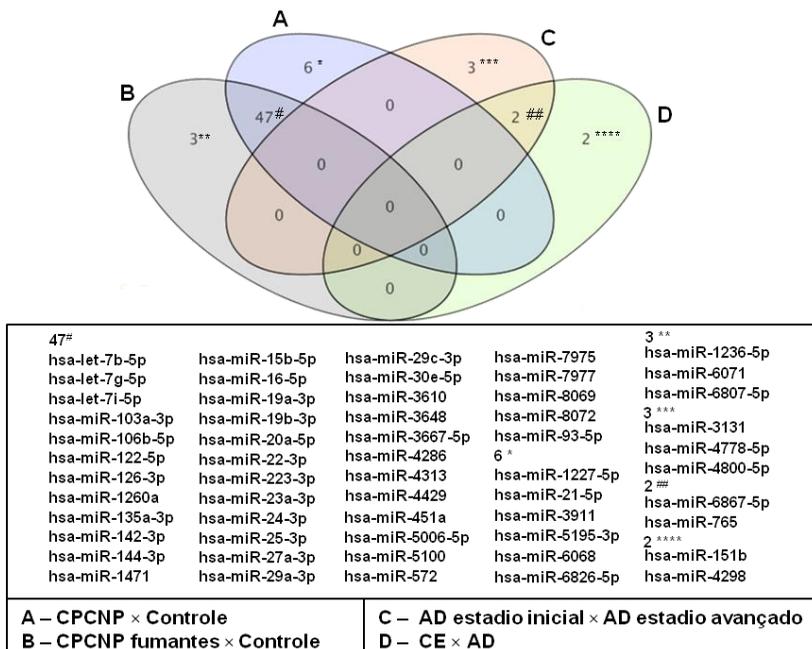
comparações, AD estadio inicial × AD estadio avançado e CE × AD (comparações C e D, respectivamente).

Tabela 8 – miRNAs diferencialmente expressos na análise de microarranjo selecionados para validação por RT-qPCR.

miRNA	Grupos comparados	Valor – <i>p</i>	FC	Regulação
<i>hsa-miR-16-5p</i>	Pacientes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	90	<i>Down</i>
	Pacientes fumantes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	63	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	Pacientes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	44	<i>Down</i>
	Pacientes fumantes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	44	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-21-5p</i>	Pacientes CPCNP × Controle saudável não fumante	0,0202	7	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-24-3p</i>	Pacientes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	62	<i>Down</i>
	Pacientes fumantes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	51	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-572</i>	Pacientes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	34	<i>Down</i>
	Pacientes fumantes CPCNP × Controle saudável não fumante	0,0202	20	<i>Down</i>
<i>hsa-miR-5006-5p</i>	Pacientes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	27	<i>Up</i>
	Pacientes fumantes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	34	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-6807-5p</i>	Pacientes fumantes CPCNP × Controle saudável não fumante	< 0,0001	5	<i>Up</i>
<i>hsa-miR-6867-5p</i>	CE × AD	0.0389	3	<i>Down</i>
	AD estadio inicial × AD estadio avançado	0.0170	3	<i>Down</i>

AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma escamoso; CPCNP, câncer de pulmão de células não pequenas; *Down*, *downregulated*; FC, *fold change*; *Up*, *upregulated*; Valor – *p*, indica o valor de *p* no teste estatístico da comparação entre os grupos.

Figura 13 – Diagrama de Venn dos miRNAs diferencialmente expressos nas seguintes comparações: A) CPCNP × Controle; B) CPCNP Fumantes × Controle; C) AD estadio inicial × AD estadio avançado e D) CE × AD.



CPCNP, Câncer de pulmão de células não pequenas; AD, Adenocarcinoma; CE, Carcinoma escamoso.

Além disso, baseado na análise de microarranjo foi selecionado o controle normalizador para a etapa das reações por RT-qPCR. Deste modo, o *hsa-miR-1273g-3p* foi elencado por apresentar valores de intensidade de fluorescência que foram detectados em todas as amostras analisadas e por não apresentar diferença estatística entre os grupos comparados.

5.2 Validação por RT-qPCR

Após a seleção dos miRNAs conforme demonstrado na Tabela 8 foi realizada a etapa de validação por RT-qPCR.

5.2.1 Características dos grupos participantes da etapa de validação

As características dos três grupos amostrais participantes desta etapa são apresentadas na Tabela 9. Além dos indivíduos participantes na análise de microarranjo, foram incluídos 15 indivíduos no grupo de pacientes com CPCNP ($n = 36$), dois indivíduos no grupo controle de indivíduos saudáveis não fumantes ($n = 15$), bem como, a inclusão de um novo grupo controle, o de indivíduos saudáveis fumantes ($n = 15$), completando os 66 participantes deste estudo. A idade dos participantes do grupo controle composto por indivíduos saudáveis não fumantes foi pareada com a idade dos pacientes com CPCNP. No entanto, com o intuito de verificar possíveis alterações na expressão de miRNAs no soro de indivíduos jovens saudáveis que possuem o hábito de fumar e que não possuíam a doença, foram selecionados participantes com idade entre 20 e 34 anos ($24,9 \pm 4,3$; média \pm DP). O grupo de pacientes foi composto por 12 indivíduos do sexo feminino e 24 do masculino, e os grupos controle por nove indivíduos do sexo feminino e seis do masculino. Entre os 36 casos de CPCNP, aproximadamente 20% apresentaram o subtipo histológico CE, enquanto que 80% dos pacientes foram acometidos pelo AD. Conforme mencionado, os casos estavam distribuídos em diferentes estádios da doença e foram divididos em dois grupos: os iniciais (I e II) e os avançados (III e IV). Observou-se que 13 pacientes estavam nas fases iniciais e 23 estavam em fases avançadas da doença. Além disso, entre todos os pacientes com CPCNP, apenas três (ou seja, 8%) não estavam expostos ao tabaco, seja de forma ativa e/ou passiva, seis (16%) eram ex-fumantes e dois (5%) pacientes eram fumantes passivos. Os fumantes representaram o maior grupo, totalizando 25 pacientes, ou seja, compreendendo aproximadamente 70% dos casos de CPCNP. (As características detalhadas de cada participante desta fase da pesquisa podem ser visualizadas nos apêndices A, B e D).

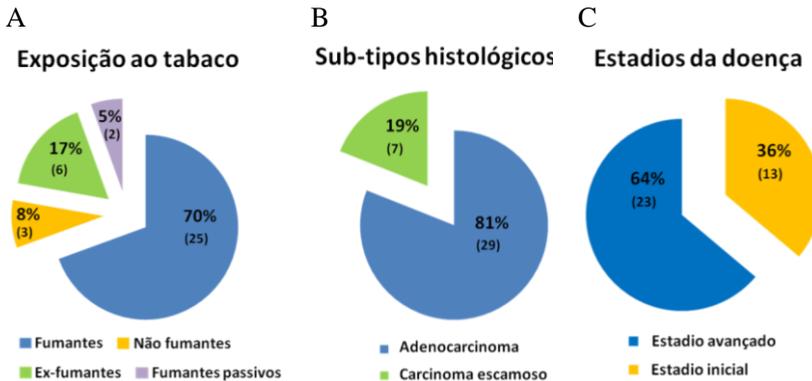
Tabela 9 – Características dos grupos utilizados na etapa de validação.

	Pacientes com CPCNP (n = 36)	Controle (Indivíduos saudáveis não fumantes) (n = 15)	Controle (Indivíduos saudáveis fumantes) (n = 15)
Idade (anos), média ± DP	66, 4 ± 9,4	56,4 ± 4,9	24,9 ± 4,3
Sexo, n (%)			
Feminino	12 (33,3)	9 (60,0)	9 (60,0)
Masculino	24 (67,7)	6 (40,0)	6 (40,0)
Exposição ao tabaco, n (%)			
Fumantes	25 (69,4)		
Não fumantes	3 (8,3)		
Ex-fumantes	6 (16,7)		
Fumantes Passivos	2 (5,6)		
Estadio TNM			
I	8 (22,2)		
II	5 (13,9)		
III	11 (30,6)		
IV	12 (33,3)		
Subtipos histológicos			
AD	29 (80,6)		
CE	7 (19,4)		

AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma escamoso, CPCNP, câncer de pulmão de células não pequenas; DP, desvio padrão.

Para melhor visualização, a Figura 14 mostra as características dos pacientes com CPCNP participantes da etapa de validação com relação ao subtipo histológico, estadios da doença e exposição ao tabaco.

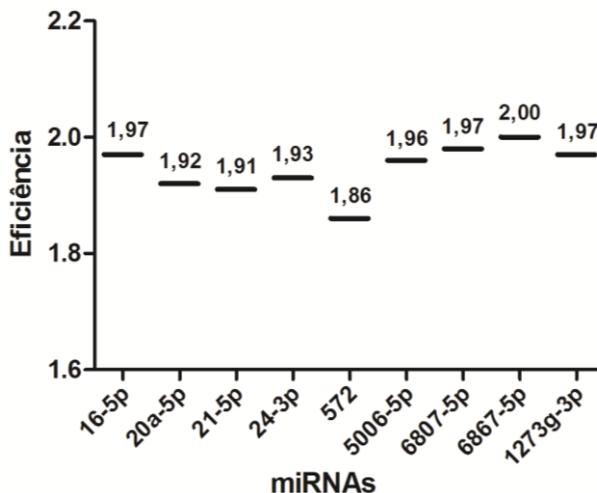
Figura 14 – Características dos pacientes com CPCNP participantes da etapa de validação. (A) Porcentagem de casos relacionados à exposição ao tabaco; (B) Porcentagem de casos relacionados ao sub-tipo histológico; (C) Porcentagem de casos relacionados aos estadios da doença.



5.2.2 Eficiência das reações de qPCR

A eficiência de amplificação dos genes alvo e do gene normalizador das reações de qPCR foram calculadas utilizando o *LinReg software*. Conforme demonstrado na Figura 15 os valores de eficiência obtidos variaram de 1,86 a 2,00. O *LinReg* considera valores entre 1,80 e 2,00 como uma amplificação eficiente (~ 100%) (RAMAKERS *et al.*, 2003; RUIJTER *et al.*, 2009). Sendo assim, a fórmula $2^{-\Delta Ct(miR-alvo - miR-endógeno)}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) pôde ser aplicada para calcular a expressão relativa dos miRNAs, pois a eficiência da qPCR foi de 100%.

Figura 15 – Eficiência da qPCR calculada pelo *software LinReg*.



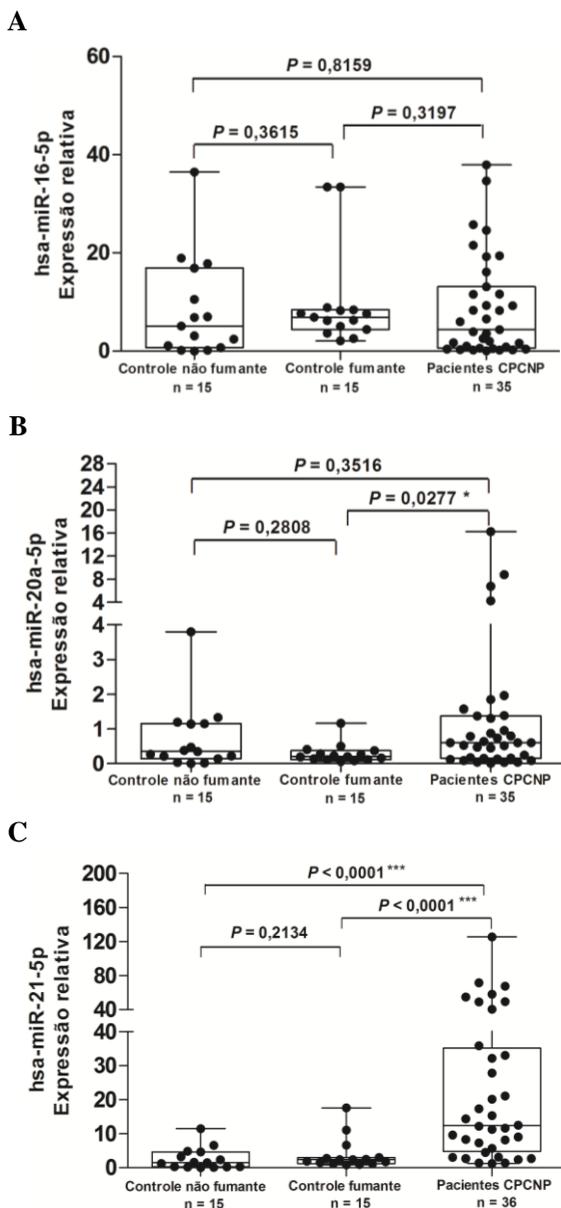
A reação de qPCR foi considerada eficiente quando os valores variaram de 1,80 a 2,00. Amostras 1 a 36 (pacientes com CPCNP), amostras 1 a 15 (controle de indivíduos saudáveis não fumantes) e amostras de 1 a 15 (indivíduos saudáveis fumantes).

5.2.3 Expressão relativa dos miRNAs selecionados

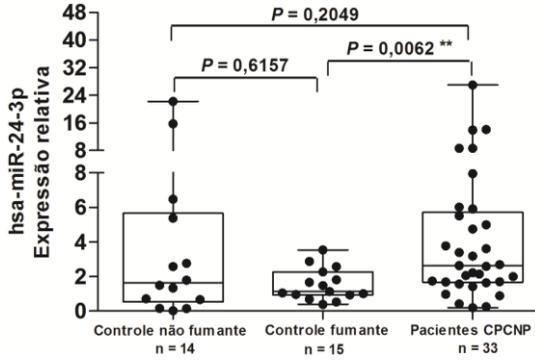
Oito miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes com CPCNP (resultantes da análise de microarranjo) foram selecionados para a etapa de validação pelo método de RT-qPCR. Conforme relatado anteriormente, a expressão destes miRNAs foi determinada em amostras de 36 pacientes com CPCNP, 15 indivíduos controle saudáveis não fumantes e 15 indivíduos controle saudáveis fumantes. As seguintes comparações foram realizadas utilizando o teste de *Mann-Whitney U*: Pacientes CPCNP × Controle não fumante, Pacientes CPCNP × Controle fumante e Controle não fumante × Controle fumante. A Figura 16 mostra a expressão relativa (Número de vezes que o nível de expressão foi alterado quando comparado ao grupo controle) dos miRNAs séricos. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dos miRNAs, *hsa-miR-16-5p* ($p = 0,8159$; Figura 16A), *hsa-miR-20a-5p* ($p = 0,3516$; Figura 16B) e o *hsa-miR-24-3p* ($p = 0,2049$; Figura 16D) nos pacientes com CPCNP em

relação ao controle não fumante. No entanto, os miRNAs, *hsa-miR-21-5p* ($p < 0,0001$; Figura 16C), *hsa-miR-572* ($p = 0,0004$; Figura 16E), *hsa-miR-5006-5p* ($p = 0,0006$; Figura 16F), *hsa-miR-6807-5p* ($p = 0,0002$; Figura 16G), and *hsa-miR-6867-5p* ($p = 0,0005$; Figura 16H) diferenciaram os pacientes com CPCNP dos indivíduos controle não fumantes com elevada significância estatística, mostrando uma expressão aumentada (*upregulated*). Quando os pacientes com CPCNP foram comparados com o segundo grupo controle (indivíduos saudáveis fumantes), não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão do *hsa-miR-16-5p* ($p = 0,3197$; Figura 16A) e do *hsa-miR-572* ($p = 0,0732$; Figura 16E). Entretanto, os miRNAs, *hsa-miR-20a-5p* ($p = 0,0277$; Figura 16B), *hsa-miR-21-5p* ($p < 0,0001$; Figura 16C), *hsa-miR-24-3p* ($p = 0,0062$; Figura 16D), *hsa-miR-5006-5p* ($p = 0,0343$; Figura 16F), *hsa-miR-6807-5p* ($p < 0,0001$; Figura 16G) e o *hsa-miR-6867-5p* ($p < 0,0001$; Figura 16H) apresentaram níveis de expressão significativamente aumentados nos pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis fumantes. Além disso, os níveis de expressão dos miRNAs séricos entre os grupos controle também foram analisados. Sendo assim, quando os indivíduos saudáveis não fumantes foram comparados com os indivíduos saudáveis fumantes não foi observado diferença estatística para os miRNAs, *hsa-miR-16-5p* ($p = 0,3615$; Figura 16A), *hsa-miR-20a-5p* ($p = 0,2808$; Figura 16B), *hsa-miR-21-5p* ($p = 0,2134$; Figura 16C), *hsa-miR-24-3p* ($p = 0,6157$; Figura 16D), *hsa-miR-5006-5p* ($p = 0,0620$; Figura 16F) e o *hsa-miR-6867-5p* ($p = 0,3099$; Figura 16H). Entretanto, a significância ocorreu para os miRNAs, *hsa-miR-572* ($p = 0,0043$; Figura 16E) e o *hsa-miR-6807-5p* ($p = 0,0079$; Figura 16G).

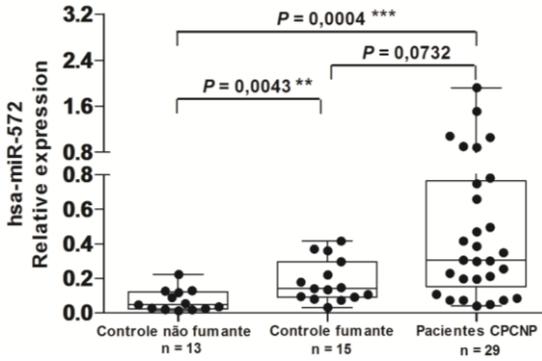
Figura 16 – Expressão relativa de miRNAs séricos (A – H) em pacientes com CPCNP e indivíduos controle (fumantes e não fumantes).



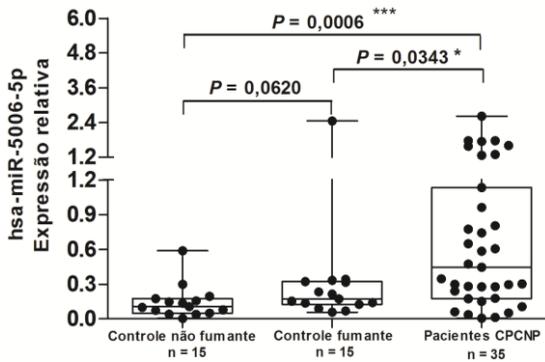
D



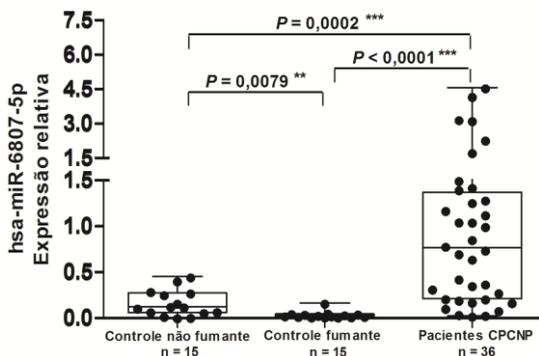
E



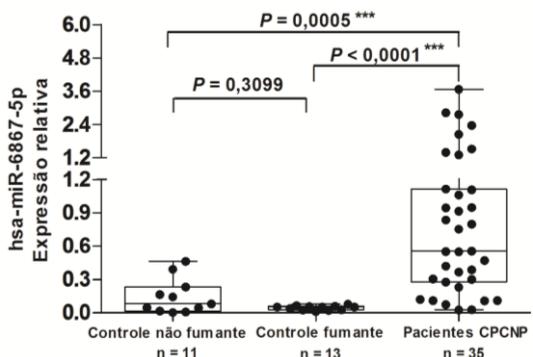
F



G



H



Grupos comparados: Pacientes CPCNP × Controle não fumante, Pacientes CPCNP × Controle fumante e Controle não fumante × Controle fumante. O número de cada participante está demonstrado no gráfico. Os valores de p indicam a diferença estatística entre os grupos comparados. (Teste de Mann-Whitney U; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

De forma geral, na etapa de validação deste estudo, os miRNAs, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e o *hsa-miR-6867-5p* apresentaram elevado perfil de expressão nos pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos dos grupos controle. Apenas o *hsa-miR-16-5p* não estava alterado no soro dos pacientes com CPCNP, este fato pode ser devido ao

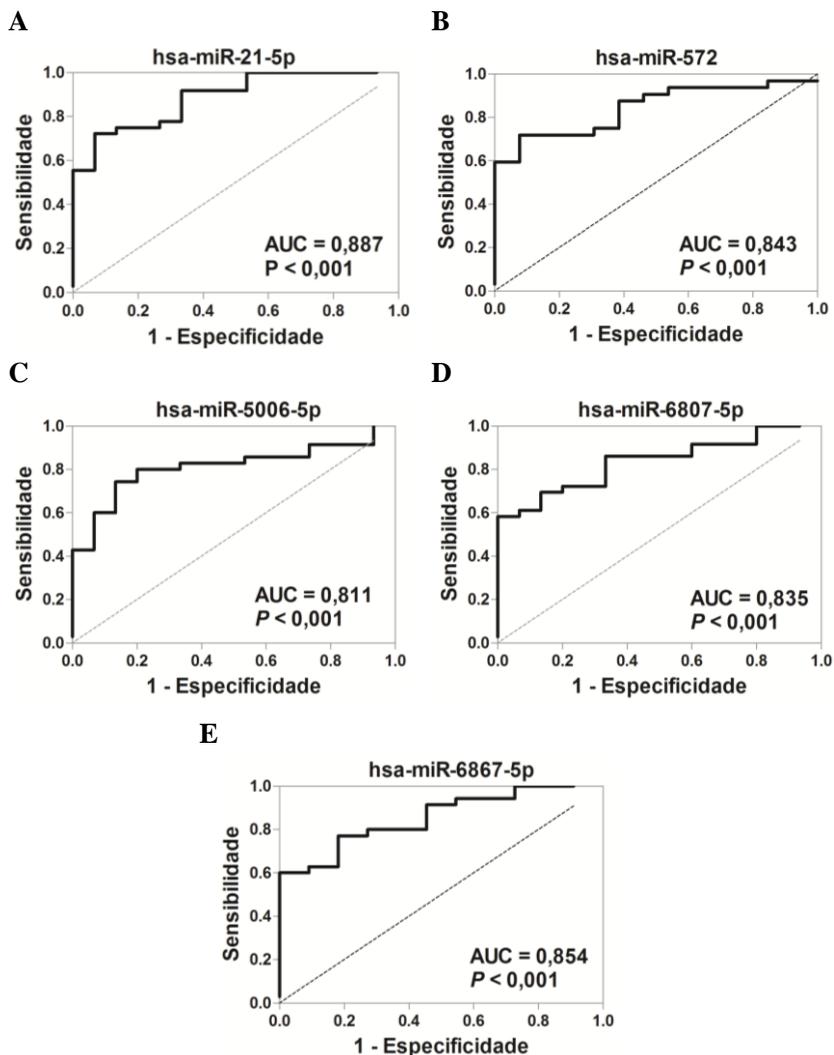
aumento no número de amostras na etapa de validação ou em virtude da diferença de sensibilidade entre os métodos (microarranjo e qPCR).

Em seguida, o grupo de pacientes com CPCNP foi estratificado com o intuito de investigar diferenças de expressão nos miRNAs selecionados em relação ao sexo, exposição ao tabaco, subtipos histológicos e estadios da doença. Sendo assim as seguintes comparações foram realizadas: feminino \times masculino; fumantes \times não fumantes; escamoso \times adenocarcinoma; estadio inicial \times estadio avançado, bem como os quatro estadios TNM (I, II, III e IV). Com base nas análises acima citadas, não foi observado diferença significativa na expressão dos miRNAs (*hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e *hsa-miR-6867-5p*) na população estudada. Os gráficos das análises acima citadas podem ser visualizados nos apêndices E, F, G, H e I, respectivamente.

5.3 Análise de curva ROC

Baseado nos miRNAs que apresentaram diferença estatística na fase de validação, a análise de curva ROC (*Receiver operating characteristic*) foi realizada para avaliar o poder diagnóstico dos candidatos a biomarcadores que distinguiram os pacientes com CPCNP dos grupos controle. Na comparação entre pacientes com CPCNP e indivíduos saudáveis não fumantes as áreas sobre a curva (AUC) dos *hsa-miR-21-5p* (Figura 17A), *hsa-miR-572* (Figura 17B), *hsa-miR-5006-5p* (Figura 17C), *hsa-miR-6807-5p* (Figura 17D) e *hsa-miR-6867-5p* (Figura 17E) foram 0,887, 0,843, 0,811, 0,835 e 0,854, respectivamente, revelando 88%, 75%, 80%, 92% e 80% de sensibilidade e 66%, 69%, 80%, 66%, e 72% de especificidade, respectivamente. Estes cinco miRNAs apresentaram uma elevada importância diagnóstica para o CPCNP.

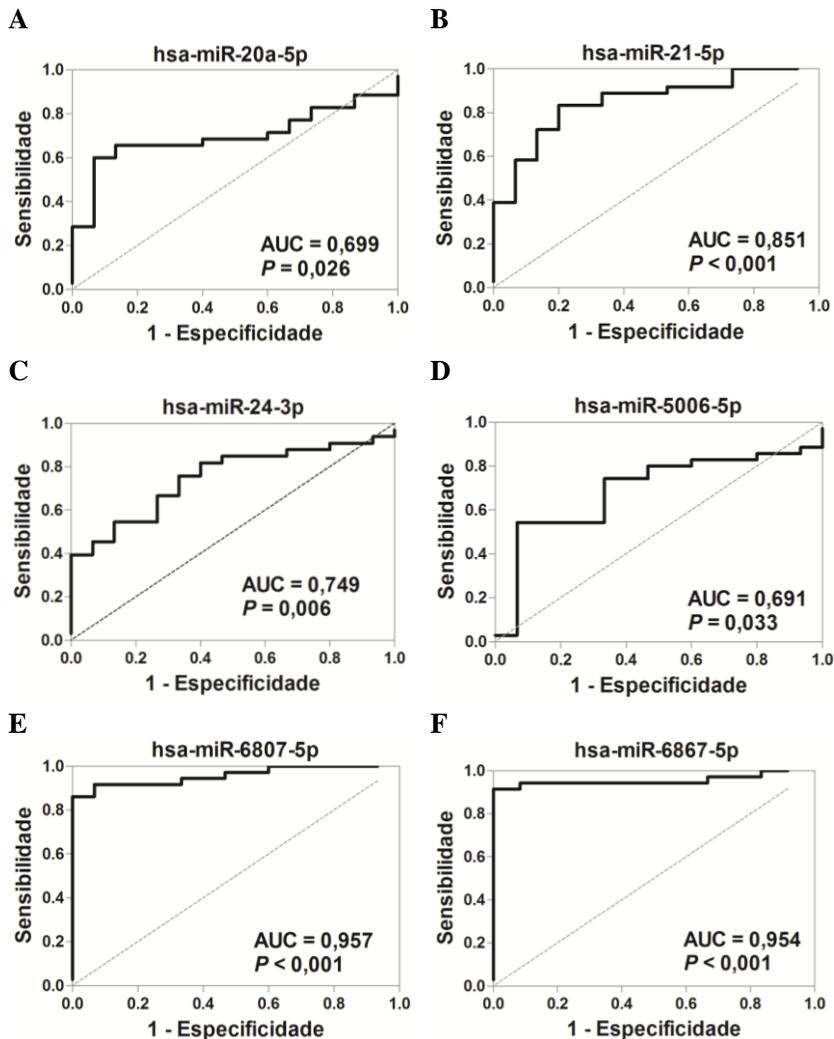
Figura 17 – Curva ROC para miRNAs séricos (Comparação: Pacientes CPCNP × Indivíduos saudáveis não fumantes).



Análise de Curva ROC mostrando a importância diagnóstica para o CPCNP dos miRNAs, (A) *hsa-miR-21-5p*, (B) *hsa-miR-572*, (C) *hsa-miR-5006-5p*, (D) *hsa-miR-6807-5p* e (E) *hsa-miR-6867-5p* que apresentaram diferença estatística na comparação de Pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis não fumantes.

Além disso, a Figura 18 mostra as AUCs dos *hsa-miR-20a-5p* (Figura 18A), *hsa-miR-21-5p* (Figura 18B), *24-3p* (Figura 18C), *hsa-miR-5006-5p* (Figura 18D), *hsa-miR-6807-5p* (Figura 18E) e *hsa-miR-6867-5p* (Figura 18F) que foram capazes de diferenciar os pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis fumantes. Os valores da AUC variaram de 0,691 – 0,957. A sensibilidade para os seis miRNAs foi de 65%, 83%, 75%, 74%, 86%, 94% e a especificidade foi de 86%, 80%, 66%, 66% e 91%, respectivamente. Nesta comparação, os *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e *hsa-miR-6867-5p* demonstraram a melhor precisão diagnóstica para o CPCNP.

Figura 18 – Curva ROC para miRNAs séricos (Comparação: Pacientes CPCNP × Indivíduos saudáveis fumantes).



Análise de Curva ROC mostrando a importância diagnóstica para o CPCNP dos miRNAs, (A) *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, (B) *hsa-miR-572*, (C) *hsa-miR-5006-5p*, (D) *hsa-miR-6807-5p*, (E) *hsa-miR-6867-5p* e (F) que apresentaram diferença estatística na comparação de Pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis fumantes.

5.4 Análise de bioinformática

Baseado nos resultados da análise de microarranjo e da etapa de validação, os miRNAs, *hsa-miR-5006-5p* e *hsa-miR-6807-5p* foram selecionados para a análise de bioinformática. A expressão significativamente elevada destes miRNAs no soro de pacientes com CPCNP está sendo relatada pela primeira vez na literatura. Para o melhor entendimento do vínculo destes dois candidatos com o câncer de pulmão a análise de predição de alvos de miRNAs foi realizada.

A análise das vias relacionadas aos alvos preditos do *hsa-miR-5006-5p* destacaram vias relacionadas com fatores de transcrição. Entre os genes desta lista, destaca-se o fator de transcrição *FOXO3* pela sua relação com o desencadeamento da apoptose e pelo seu envolvimento com a tumorigênese quando desregulado (HUTVAGNER *et al.*, 2001). Diante deste cenário, hipotetiza-se que o *hsa-miR-5006-5p* possa estar envolvido na regulação do gene *FOXO3* no CPCNP. Além disso, várias vias relacionadas com o supressor tumoral *p53* estão associadas a alvos preditos do *hsa-miR-6807-5p*. Também foram encontradas vias relacionadas com inflamação, como a diferenciação de células *natural killer* e a regulação da importação do fator nuclear Kappa B (*NF-kB*) para o núcleo da célula. Entre os alvos validados, foram encontrados muitos genes relacionados à família de fatores de transcrição *ZNF* (*zinc finger family*). Sendo assim, a expressão aumentada do *hsa-miR-6807-5p* pode estar relacionada com alterações de muitos fatores de transcrição como os da família *ZNF*, os quais podem contribuir para o desenvolvimento e progressão do CPCNP.

6. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é uma neoplasia maligna com elevada frequência no mundo todo, apresentando alta letalidade e incidência crescente. Entre os fatores de risco, o tabagismo está fortemente associado ao aparecimento da maioria dos casos (SIEGEL *et al.*, 2018). Há mais de três décadas estudos epidemiológicos na Grã-Bretanha mostraram uma forte correlação entre o hábito de fumar e a incidência de câncer de pulmão, tanto em homens quanto em mulheres (DOLL *et al.*, 1980). É atribuído que aproximadamente 90% dos casos ocorrem devido ao hábito de fumar e 5% devido ao tabagismo passivo (LOURENÇO e KIRCHENCHTEJN, 2016). Em nosso estudo, apenas três casos de CPCNP não estavam relacionados ao tabagismo, possivelmente associados a outros fatores de risco (herança genética, exposição ocupacional ou outros fatores), entretanto, 75% dos casos diagnosticados estavam associados à exposição ao tabaco, seja de forma ativa ou passiva. Além disso, 16% dos indivíduos eram ex-fumantes. Com relação a este grupo, não é de nosso conhecimento há quanto tempo os pacientes abandonaram o hábito de fumar. Interessante salientar que o risco de câncer de pulmão em ex-fumantes reduz para 50% após 15 anos de cessar o hábito (MONG *et al.*, 2011). Atualmente é estimado que 80 a 90% das mortes por câncer de pulmão entre os homens e 75% entre as mulheres estão relacionadas ao hábito de fumar (WHO, 2018). Além disso, a alta taxa de mortalidade dos pacientes com CPCNP deve-se em grande parte ao fato de que o diagnóstico ocorre em fases tardias da doença, quando a possibilidade de um tratamento cirúrgico já está limitada, como é a realidade de 64% dos pacientes do presente estudo, os quais foram diagnosticados em fases avançadas da doença. Desta forma, assumindo que o câncer de pulmão progride sequencialmente dos estádios I-IV, quanto mais cedo for o diagnóstico, maiores são as chances de cura e/ou aumento de sobrevida (FLORCZUK *et al.*, 2017). No presente estudo 36% dos pacientes foram diagnosticados em estádios iniciais e segundo Howlander *et al.*, (2014) as estatísticas mundiais apresentam uma taxa ainda menor, em que 16% dos pacientes portadores de câncer de pulmão são diagnosticados nas fases iniciais da doença. Contudo, Florczuk *et al.*, (2017) ressalta que um dos grandes problemas é a escassez de métodos

efetivos para a detecção do CPCNP em fases iniciais. Nas últimas duas décadas houve um progresso considerável no que diz respeito aos mecanismos moleculares do CPCNP, como é o caso do diagnóstico personalizado, baseado na classificação do tumor e as respectivas características moleculares, implicando na escolha terapêutica direcionada.

Certamente, o diagnóstico do câncer de pulmão ainda é um desafio devido à ausência de sintomas clínicos e programas eficazes de rastreamento. De fato, a maioria dos casos de câncer de pulmão é detectada em um estágio tardio e intratável (GRIDELLI *et al.*, 2015). Além disso, o diagnóstico do CPNPC na fase inicial é o elemento chave no sucesso da terapia, bem como, melhora significativamente as taxas de sobrevida dos pacientes (SONG *et al.*, 2018). Os miRNAs são fundamentais na regulação gênica, bem como, na tumorigênese, abrindo novos campos na pesquisa de biomarcadores, principalmente como uma ferramenta de diagnóstico (MARKOU *et al.*, 2016). Recentemente, estudos relacionados aos miRNAs circulantes estão surgindo como novos potenciais biomarcadores inclusive para o câncer de pulmão, uma vez que podem ser detectados em diversos fluídos corporais de forma estável e não invasiva. Neste contexto, o presente estudo buscou explorar o uso potencial de miRNAs circulantes como candidatos a biomarcadores para auxiliar no diagnóstico do CPCNP. A primeira etapa compreendeu a análise de microarranjo, a qual permite investigar os níveis de expressão de vários miRNAs numa única análise. Por meio desta tecnologia, diversos miRNAs foram identificados como diferencialmente expressos no soro de pacientes com CPCNP nas diferentes comparações realizadas. Entre os miRNAs alterados, oito miRNAs (*hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e *hsa-miR-6867-5p*) foram selecionados para a segunda etapa do estudo, a validação pelo método de RT-qPCR. Sendo assim, os miRNAs *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e *hsa-miR-6867-5p* foram estatisticamente significantes mostrando níveis de expressão elevados quando comparados aos grupos controle (indivíduos saudáveis fumantes e não fumantes).

Além do presente trabalho, diversos estudos têm relatado o envolvimento do *hsa-miR-21-5p* com o CPCNP. Jiang *et al.* (2013) e Yang *et al.* (2018) demonstraram que níveis elevados do *hsa-miR-21-5p* foram encontrados no soro de pacientes com CPCNP e foram

associados à um mau prognóstico. Em outro estudo, a superexpressão do *hsa-miR-21-5p* no soro de pacientes com CPCNP foi fortemente associada a metástases linfonodais e ao estágio avançado da doença (LIU *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores (2016) também mostraram que o nível de expressão do *hsa-miR-21-5p* estava significativamente elevado em pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis. Além disso, foi observado que o nível de expressão deste miRNA reduziu rapidamente no plasma após a remoção cirúrgica dos tumores. A elevada expressão do *hsa-miR-21-5p* tem sido implicada fortemente ao CPCNP, ao passo que, este miRNA foi classificado como um *oncomir*, o qual está envolvido no desenvolvimento e progressão desta neoplasia (ZHU *et al.*, 2007). Foi reportado que o *hsa-miR-21* é regulador do gene supressor tumoral *PTEN*. Este gene participa da regulação do ciclo celular protegendo as células do crescimento e divisão descontrolada, no entanto mutações em *PTEN* estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento do câncer. Foi demonstrado que o *hsa-miR-21* alterado reprime o supressor tumoral *PTEN* e estimula o crescimento e invasão no CPCNP, deste modo, em resposta a expressão aumentada do miR-21 a expressão de *PTEN* é reduzida, indicando uma baixa sobrevida nos pacientes portadores da doença (JIANG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Ainda, Seike e colaboradores (2009) demonstraram uma correlação significativa entre o gene *EGFR* e os elevados níveis de expressão do *hsa-miR-21* no câncer de pulmão. Além disso, foi relatado que a supressão do *hsa-miR-21* por um inibidor de tirosina cinase (AG1478) mostrou que a via de sinalização de *EGFR* regula a expressão do *hsa-miR-21*. Neste contexto, o aumento da expressão do *hsa-miR-21*, que é reforçada pela via de sinalização do *EGFR*, desempenha um papel significativo na carcinogênese pulmonar em pessoas que nunca fumaram, assim como em fumantes. Também foi demonstrado *in vivo* que a superexpressão do *hsa-miR-21* acentua a tumorigênese e que a deleção genética deste miRNA apresenta efeito protetor contra a formação dos tumores (HATLEY *et al.*, 2010). Neste contexto, a superexpressão do *hsa-miR-21-5p*, o qual vêm sendo amplamente estudado, sugere grande importância no diagnóstico do CPCNP, bem como no acompanhamento dos pacientes durante e após o tratamento desta malignidade.

A alteração do *hsa-miR-24* também foi relatada por Zhao *et al.* (2012), o qual mostrou um aumento do *hsa-miR-24* no soro e no tecido de pacientes com CPCNP e a alta expressão deste miRNA foi correlacionada com uma menor sobrevida dos pacientes. Também foi

observado que a depleção do *hsa-miR-24* inibiu a proliferação celular e reduziu a capacidade de formação de tumores em camundongos. Em outro estudo, de Le e colaboradores (2012), demonstraram que o nível de expressão do *hsa-miR-24* estava elevada no soro de pacientes com câncer de pulmão em relação ao grupo controle composto por indivíduos saudáveis. Positivamente, após a retirada dos tumores, os níveis de expressão deste miRNA estava significativamente diminuído quando comparado com as amostras da fase pré-operatória. Além disso, a superexpressão do *hsa-miR-20a-5p* também foi relatada em pacientes com CPCNP, e após o tratamento cirúrgico baixos níveis de expressão foram encontrados no plasma destes pacientes (ZHANG *et al.*, 2016). É importante ressaltar que muitos miRNAs são encontrados individualmente, enquanto outros podem estar agrupados (*clustered miRNAs*) e parecem atuar cooperativamente (SUN *et al.*, 2013). O *hsa-miR-20a-5p* é um importante membro pertencente ao *cluster hsa-miR-17-92*. Estes miRNAs são responsáveis pela homeostase e desenvolvimento normal do pulmão, cujas alterações de expressão tem sido implicadas em várias doenças pulmonares inclusive no câncer (EBI *et al.*, 2009; ROGERS *et al.*, 2015). Foi relatado que a superexpressão dos membros do *cluster hsa-miR-17-92* pode estar relacionada com a baixa expressão do gene *PTEN* deste modo, promovendo a proliferação celular e a progressão do câncer (XIAO *et al.*, 2008; OSADA e TAKAHASHI, 2011). Os resultados deste estudo também mostraram que o *hsa-miR-6867-5p* apresentou uma excelente sensibilidade e especificidade quando se trata do poder diagnóstico, emergindo como um potente candidato para auxiliar na detecção do CPCNP. Além disso, este é o primeiro estudo que relaciona os altos níveis de expressão deste miRNA com o CPCNP.

O adenocarcinoma representa o subtipo histológico predominante entre todos os tipos de câncer de pulmão (40%), enquanto que o carcinoma escamoso possui frequência menor, aproximadamente 20% dos casos (DAVIDSON *et al.*, 2013; TRAVIS *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudos demonstraram que embora todos os tipos histológicos estão associados à exposição ao tabaco, existe uma forte associação de indivíduos fumantes com o carcinoma escamoso, e de indivíduos não fumantes com o adenocarcinoma (GABRIELSON, 2006; SUN *et al.*, 2007). Entretanto, estudos vêm demonstrando que os casos de adenocarcinoma estão se tornando mais comuns entre os fumantes, e que estão aumentando consideravelmente nos últimos anos (KENFIELD *et al.*, 2008; GROOT e MUNDEN, 2012). Realidade também

encontrada no presente estudo, que além do carcinoma escamoso ser o subtipo histológico menos frequente, todos os casos foram associados ao tabagismo, enquanto que os casos de adenocarcinoma, subtipo predominante, caracterizaram-se por apresentar 18 fumantes, seis ex-fumantes, dois não fumantes e dois fumantes passivos. Atualmente, a classificação diagnóstica destes tumores é baseada nos exames histológicos. Neste contexto, os miRNAs também estão surgindo como potentes ferramentas para auxiliar a distinguir os subtipos histológicos do CPCNP como é o caso do adenocarcinoma e do carcinoma escamoso. O estudo de Del Vescovo e colaboradores (2012) demonstrou que os níveis de expressão do *hsa-miR-205* estavam significativamente diminuídos no carcinoma escamoso quando comparado ao adenocarcinoma. No entanto, na etapa de validação do presente trabalho não foram observadas diferenças significativas na expressão dos miRNAs em relação a comparação AC × CE. Diante disso, estudos futuros serão interessantes para alavancar a busca de novos miRNAs que sejam capazes de diferenciar os subtipos histológicos do CPCNP e eventualmente contribuir para a escolha terapêutica direcionada.

No presente estudo, observou-se significância estatística nos níveis de expressão do *hsa-miR-572* na comparação entre os grupos controle (indivíduos saudáveis não fumantes em relação aos indivíduos saudáveis fumantes). Sabe-se que o consumo de tabaco na forma de cigarros é um hábito mundial e de fato, o tabagismo é um fator de risco bem estabelecido por estar fortemente associado ao aparecimento do câncer de pulmão (XIAO *et al.*, 2008). A exposição sistêmica e crônica de nicotina está associada às modificações genômicas específicas das vias aéreas, bem como dos tecidos pulmonares e tem sido implicada na desregulação de vários miRNAs (KERR, K. M., 2001; VERMA e LAUTENSCHLAEGER, 2016; INCA, 2018d). Neste trabalho, a expressão elevada do *hsa-miR-572* nos indivíduos saudáveis fumantes (idade entre 20 e 34 anos) em relação aos indivíduos não fumantes mostrou uma tendência de que o tabagismo pode contribuir com alterações nos níveis de expressão dos miRNAs, conduzindo para o desenvolvimento do CPCNP. Neste contexto, Shi e colaboradores mostraram miRNAs alterados quando indivíduos jovens saudáveis fumantes foram comparados com indivíduos saudáveis não fumantes. Foi observado que o *hsa-miR-572* também estava alterado nos indivíduos fumantes, sugerindo que indivíduos jovens fumantes apresentam alta suscetibilidade para o desenvolvimento do CPCNP, sendo a idade um fator determinante para o surgimento da doença (SHI

et al., 2016). Além disso, com o intuito de verificar a desregulação de miRNAs associada ao tabagismo, Huang *et al.* (2014) verificaram os níveis de expressão de miRNAs no soro de três grupos amostrais, pacientes com CPCNP (associados ao tabagismo), indivíduos fumantes e não fumantes. Com base nos resultados, foi demonstrado que o miR-let-7i-3p estava alterado no soro de pacientes com CPCNP bem como no controle fumante, evidenciando o fato de que a exposição ao tabaco pode induzir alterações na expressão de miRNAs séricos e consequente estar associado ao CPCNP.

Adicionalmente, este estudo revelou que o *hsa-miR-5006-5p* apresentou diferença significativa em distinguir os pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis não fumantes, bem como, demonstrou boa sensibilidade e especificidade para diagnosticar a doença. Importante ressaltar que este é o primeiro estudo a mostrar altos níveis de expressão do *hsa-miR-5006-5p* em pacientes com CPCNP. Além disso, baseado no resultado da análise de bioinformática, foi identificado que o *hsa-miR-5006-5p* pode estar envolvido com a regulação do gene *FOXO3* (*Forkhead box O3*) no CPCNP. A desregulação dos fatores de transcrição da família *FOX* tem um papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer, como a proliferação celular descontrolada e resistência a apoptose (HUTVAGNER *et al.*, 2001). De fato, estudos têm evidenciado a baixa expressão do gene *FOXO3* no CPCNP (HERZOG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015). No estudo de Liu *et al.* (2015) a regulação *down* deste gene estava significativamente relacionada com o nível de malignidade dos tumores, estadiamento TNM e metástase linfonodal. Deste modo, a desregulação do *FOXO3* pode desempenhar um papel importante na ocorrência e desenvolvimento do CPCNP. Além disso, este gene está envolvido na apoptose mediada por cisplatina, desta forma, atenua o efeito do fármaco em pacientes com câncer de pulmão (LIU *et al.*, 2014). Neste trabalho, o *hsa-miR-5006-5p* estava *upregulated* em pacientes com CPCNP, portanto, um alto nível de expressão desse miRNA pode contribuir para a baixa regulação do *FOXO3*, tornando-se um biomarcador relacionado ao desenvolvimento do câncer de pulmão.

Este trabalho também mostrou com alta significância níveis elevados do *hsa-miR-6807-5p* nos pacientes com CPCNP em relação aos indivíduos saudáveis dos grupos controle (fumantes e não fumantes), bem como, demonstrou boa sensibilidade e especificidade quanto ao poder diagnóstico para o CPCNP. Além disso, por meio deste estudo, os altos níveis de expressão do *hsa-miR-6807-5p* no soro de

pacientes com CPCNP também estão sendo apresentados pela primeira vez na literatura. Ainda, foi demonstrado neste trabalho que o *hsa-miR-6807-5p* pode estar envolvido no CPCNP por meio da regulação de alguns fatores de transcrição como a família *ZNF* (*Zinc finger family*). Nas últimas décadas, evidências crescentes têm mostrado o papel da família *ZNF* na progressão do câncer. Estes fatores de transcrição ligam-se a seqüências específicas de DNA, controlando assim a transcrição gênica. Sendo assim, a expressão desregulada, ativação ou inativação de fatores de transcrição através de mutações e translocações desempenham papéis críticos na tumorigênese (JIANG *et al.*, 2012), como é o caso do supressor tumoral *ZNF545* o qual apresentou expressão diminuída em células de câncer de pulmão (CHENG *et al.*, 2012). Curiosamente, foi demonstrado que a perda de atividade de *ZNF33* (Kaiso) induzida pela fumaça do cigarro pode alterar a expressão de alguns genes e estar envolvida com o câncer de pulmão (ZHANG *et al.*, 2016). Neste sentido, a desregulação deste miRNA pode ser uma indicação de expressão alterada de alguns fatores de transcrição, como a família *ZNF*, que, por sua vez, pode aumentar a progressão e o desenvolvimento do câncer. Com base nos resultados aqui apresentados, o miRNA-6807-5p pode ser útil no diagnóstico de CPCNP como um potencial biomarcador não invasivo.

Neste contexto, os miRNAs circulantes apresentam grande potencial para atuarem como biomarcadores não invasivos auxiliando no diagnóstico do CPCNP orientando a decisão clínica, pois conforme exposto na literatura e demonstrado neste trabalho, a expressão diferencial, desregulada destes pequenos RNAs está associada ao desenvolvimento, invasão e metástase.

7. CONCLUSÃO

- Este estudo identificou com sucesso diferenças nos níveis de expressão de miRNAs circulantes no soro de pacientes com CPCNP em comparação aos indivíduos dos grupos controle.
- Os miRNAs *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e o *hsa-miR-6867-5p* apresentaram expressão elevada no soro de pacientes com CPCNP e mostraram uma interessante abordagem diagnóstica.
- Na comparação da expressão relativa dos miRNAs em relação as características clínicas dos pacientes com CPCNP não houve diferença entre os grupos analisados, em relação ao sexo dos pacientes, subtipo histológico, exposição ao tabaco e ao estadió da doença, possivelmente com o aumento no número de casos poderia confirmar a diferença entre os grupos.
- Os miRNAs *hsa-miR-5006-5p* e *hsa-miR-6807-5p* parecem estar envolvidos com genes ligados ao câncer de pulmão, e a relação destes dois miRNAs com o CPCNP está sendo relatada pela primeira vez na literatura.
- Os miRNAs *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-572*, *hsa-miR-5006-5p*, *hsa-miR-6807-5p* e o *hsa-miR-6867-5p* são potenciais biomarcadores, e aliados a outros estudos, representam uma nova estratégia para o diagnóstico auxiliar do CPCNP.
- Estes miRNAs também podem atuar como marcadores para o monitoramento pós-cirúrgico e no acompanhamento dos pacientes com CPCNP submetidos às terapias farmacológicas.
- Além disso, estes miRNAs séricos podem ser úteis como uma ferramenta não invasiva na triagem de grupos que apresentam alto risco para o desenvolvimento do CPCNP.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Verificar experimentalmente a relação do gene predito *FOXO3* com o *hsa-miR-5006-5p*.
- ✓ Verificar experimentalmente a relação da família *ZNF* com o *hsa-miR-6807-5p*.
- ✓ Verificar a expressão dos miRNAs validados neste estudo no soro de pacientes com CPCNP que já foram submetidos a algum tipo de tratamento, seja cirúrgico, químico ou radioterápico com o intuito de serem utilizados no monitoramento da doença.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. C. Estadio Clínico I. In: YOULE, RICHARD J. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo-SP, Brasil, 2016. p.73-83.

ACS. Cancer Facts & Figures 2018. Disponível em: < <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf> >. 2018. Acessado em: 29/10/2018.

AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, v. 4, Aug 12 2015.

AKOPYAN, G.; BONAVIDA, B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. **Int J Oncol**, v. 29, n. 4, p. 745-52, Oct 2006.

ALTINTAS, Z.; TOTHILL, I. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, n. 0, p. 988-998, 2013.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 09/16/print 2004.

ARROYO, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 12, p. 5003-8, Mar 22 2011.

AUSHEV, V. N. et al. Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78649, 2013.

BABIZHAYEV, M. et al. Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior. **Am J Ther.**, v. 18, p. 209-226, 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, Jan 23 2009.

CHEN, X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Res**, v. 18, n. 10, p. 997-1006, 2008.

CHEN, Z. et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535-546, 2014.

CHENG, Y.-L. et al. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 23, n. 2, p. 221-228, February 1, 2003 2003.

CHENG, Y. et al. A novel 19q13 nucleolar zinc finger protein suppresses tumor cell growth through inhibiting ribosome biogenesis and inducing apoptosis but is frequently silenced in multiple carcinomas. **Mol Cancer Res**, v. 10, n. 7, p. 925-36, Jul 2012.

CORRÊA, R. L. et al. Abordagens computacionais e moleculares para identificação de alvos de microRNAs. In: LORETO, É. L. S. (Ed.). **Introdução ao mundo dos microRNAs**. Ribeirão Preto, SP, 2015. p.237-254.

CREEMERS, E. E.; TIJSEN, A. J.; PINTO, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? **Circ Res**, v. 110, n. 3, p. 483-95, Feb 3 2012.

CRUZ, M. R. S. et al. Estadio Clínico IV. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo - SP, Brasil, 2016. p.157-178.

DAVIDSON, M. R.; GAZDAR, A. F.; CLARKE, B. E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. **J Thorac Dis**, v. 5 Suppl 5, p. S463-78, Oct 2013.

DELA CRUZ, C. S.; TANOUE, L. T.; MATTHAY, R. A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. **Clin Chest Med**, v. 32, n. 4, p. 605-44, Dec 2011.

DO AMARAL, A. E. et al. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 274-287, 2018/02/01/2018.

DOLL, R. et al. Mortality in relation to smoking: 22 years's observations on female British doctors. **British Medical Journal**, p. 967-971, 1980.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11-22, 2003.

DUPAGE, M. et al. Endogenous T cell responses to antigens expressed in lung adenocarcinomas delay malignant tumor progression. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 72-85, Jan 18 2011.

EBI, H. et al. Counterbalance between RB inactivation and miR-17-92 overexpression in reactive oxygen species and DNA damage induction in lung cancers. **Oncogene**, v. 28, n. 38, p. 3371-9, Sep 24 2009.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259-69, Apr 2006.

ETHERIDGE, A. et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. **Mutat Res.**, p. 85-90, 2011.

FISS, E. Câncer de Pulmão: Epidemiologia. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo - São Paulo, Brasil, 2016. cap. 1, p.15-20.

FLORCZUK, M.; SZPECHCINSKI, A.; CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, J. miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. **Targeted Oncology**, v. 12, n. 2, p. 179-200, 2017.

GABRIELSON, E. Worldwide trends in lung cancer pathology. **Respirology**, v. 11, n. 5, p. 533-8, Sep 2006.

GBD, T. C. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, Apr 05 2017.

GOLDSTRAW, P. et al. Non-small-cell lung cancer. **Lancet**, v. 378, n. 9804, p. 1727-40, Nov 12 2011.

GREENBERG, R. A. et al. Measuring the Exposure of Infants to Tobacco Smoke. **New England Journal of Medicine**, v. 310, n. 17, p. 1075-1078, 1984.

GRIDELLI, C. et al. Non-small-cell lung cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15009, May 21 2015.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Database issue, p. D140-D144, 2006.

GROOT, P.; MUNDEN, R. F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. **Radiologic Clinics of North America**, v. 50, n. 5, p. 863-876, 2012.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 8, p. 509-24, Aug 2014.

HALLBERG, B.; PALMER, R. H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 10, p. 685-700, 2013.

HALVORSEN, A. R. et al. A unique set of 6 circulating microRNAs for early detection of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, p. 37250-37259, Jun 14 2016.

HAMMOND, S. M. et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1146-50, Aug 10 2001.

HAN, J. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 887-901, Jun 2 2006.

HANRIOT, R. Estadio IIIB. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo-SP, Brasil, 2016. p.145-154.

HATLEY, M. E. et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. **Cancer Cell**, v. 18, n. 3, p. 282-93, Sep 14 2010.

HAURA, E. B. et al. Molecular origins of lung cancer: prospects for personalized prevention and therapy. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 6 Suppl 3, p. S207-13, Jun 2010.

HECHT, S. S. Lung Carcinogenesis by Tobacco Smoke. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, n. 12, p. 2724-2732, 10/03 2012.

HEEGAARD, N. H. et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. **Int J Cancer**, v. 130, n. 6, p. 1378-86, Mar 15 2012.

HERZOG, C. R. et al. FoxO3a gene is a target of deletion in mouse lung adenocarcinoma. **Oncol Rep**, v. 22, n. 4, p. 837-43, Oct 2009.

HOWLADER N et al. Bethesda - MD, United States of America. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Disponível em: < https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/ >. 2014. Acessado em: 30/04/2017.

HU, W. et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. **Mol Cell**, v. 38, n. 5, p. 689-99, Jun 11 2010.

HUANG, J. et al. Deregulation of serum microRNA expression is associated with cigarette smoking and lung cancer. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 364316, 2014.

HUTVAGNER, G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 834-8, Aug 3 2001.

IASLC. International Association for the study of Lung Cancer. 8th Edition Lung Cancer TNM Staging Summary. Disponível em: < https://www.iaslc.org/sites/default/files/wysiwyg-assets/iaslc_8th_posters_24x36_2018_final_version_1.pdf >. 2018. Acessado em: 05/11/2018.

INAMURA, K. et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. **Mod Pathol**, v. 22, n. 4, p. 508-15, Apr 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Câncer. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> >. 2018a. Acessado em: 15/11/2018.

_____. Câncer de Pulmão. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao> >. 2018b. Acessado em: 30/10/2018.

_____. Câncer de pulmão - Diagnóstico Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/diagnostico1> >. 2018c. Acessado em: 29/10/2018.

_____. ESTIMATIVAS 2018 Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf> >. 2018d. Acessado em: 29/10/2018.

_____. Instituto Nacional do Câncer. Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/si >

te/home/dados_numeros/prevalencia-de-tabagismo >. 2018e. Acessado em: 15112018.

JIANG, M. et al. The role of ZFX in non-small cell lung cancer development. **Oncol Res**, v. 20, n. 4, p. 171-8, 2012.

JIANG, M. et al. Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 383, n. 1, p. 67-75, 2013.

JOHNSON, S. M. et al. RAS is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 635-647, 2005.

JOHNSON, S. M. et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 635-47, Mar 11 2005.

KAWANO, O. et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. **Lung Cancer**, v. 54, n. 2, p. 209-15, Nov 2006.

KENFIELD, S. A. et al. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. **Tob Control**, v. 17, n. 3, p. 198-204, Jun 2008.

KERR, K. Pulmonary preinvasive neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 4, p. 257-271, 2001.

KERR, K. M. Pulmonary preinvasive neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 4, p. 257, 2001.

KETTING, R. F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes Dev**, v. 15, n. 20, p. 2654-9, Oct 15 2001.

KIRSCHNER, M. et al. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. 94, 2013-May-24 2013.

KORBES, A. P., FREITAS, F. C. Análise molecular de microRNAs. In: LORETO, É. L. S. (Ed.). **Introdução ao mundo dos microRNAs**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

KOSAKA, T. et al. Mutations of the **Epidermal Growth Factor Receptor**; Gene in Lung Cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 24, p. 8919, 2004.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-858, October 26, 2001.

LE CALVEZ, F. et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. **Cancer Res**, v. 65, n. 12, p. 5076-83, Jun 15 2005.

LE, H. B. et al. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients. **Med Oncol**, v. 29, n. 5, p. 3190-7, Dec 2012.

LE, M. T. et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. **Genes Dev**, v. 23, n. 7, p. 862-76, Apr 01 2009.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 12/3/ 1993.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J.**, v. 23, p. 4051-4060, 2004.

LI, J. et al. Expression of microRNA-96 and its potential functions by targeting FOXO3 in non-small cell lung cancer. **Tumour Biol**, v. 36, n. 2, p. 685-92, Feb 2015.

LIU, H. et al. FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in lung cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 8, p. 898-907, Sep 2014.

LIU, H. B. et al. Expression and prognostic implications of FOXO3a and Ki67 in lung adenocarcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 4, p. 1443-8, 2015.

LIU, X. G. et al. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. **Med Oncol**, v. 29, n. 2, p. 618-26, Jun 2012.

LIU, Z.-L. et al. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 372, n. 1-2, p. 35-45, 2013/01/01 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 12// 2001.

LORENZI, J. C. C.; ZANETTE, D. L. Uso de miRNAs no diagnóstico e prognóstico e terapêutica. In: PEREIRA, T. C. (Ed.). **Introdução ao mundo dos microRNAs**. Ribeirão Preto-SP, Brasil, 2015.

LOURENÇO, M. T. C.; KIRCHENCHTEJN, C. Prevenção e Fatores de Risco para Câncer de Pulmão. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo - SP, Brasil, 2016. cap. 2, p.21-33.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834-838, 2005.

MARKOU, A.; ZAVRIDOU, M.; LIANIDOU, E. S. miRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 19-27, 03/02 2016.

MASCAUX, C. et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 92, n. 1, p. 131-139, 2004.

MOHAMMED, J.; SIEPEL, A.; LAI, E. C. Diverse modes of evolutionary emergence and flux of conserved microRNA clusters. **Rna**, v. 20, n. 12, p. 1850-63, Dec 2014.

MONG, C. et al. High prevalence of lung cancer in a surgical cohort of lung cancer patients a decade after smoking cessation. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 6, n. 1, p. 19, 2011.

MOORE, E. Non-Small Cell Lung Cancer Disponível em: < <http://www.curetoday.com/publications/cure/2016/lung-2016/medical-illustration-nonsmall-cell-lung-cancer> >. 2016. Acessado em: 15/11/2018.

MS. PORTARIA N° 957, DE 26 DE SETEMBRO DE 2014. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Pulmão. Brasília - DF, Brasil 2014.

NEGRI, E. Diagnóstico e Estadiamento Inicial de Câncer de Pulmão. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo-SP, Brasil, 2016. p.49-59.

OSADA, H.; TAKAHASHI, T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p. 2-12, January 1, 2007 2007.

OSADA, H.; TAKAHASHI, T. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. **Cancer Sci**, v. 102, n. 1, p. 9-17, Jan 2011.

PARASKEVOPOULOU, M. D. et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. W169-73, Jul 2013.

PASTORKOVA, Z.; SKARDA, J.; ANDEL, J. The role of microRNA in metastatic processes of non-small cell lung carcinoma. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 160, n. 3, p. 343-57, Sep 2016.

PATNAIK, S. K. et al. Evaluation of MicroRNA Expression Profiles That May Predict Recurrence of Localized Stage I Non-Small Cell Lung Cancer

after Surgical Resection. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 36-45, January 1, 2010 2010.

PHAM, D. et al. Use of Cigarette-Smoking History to Estimate the Likelihood of Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor Gene Exons 19 and 21 in Lung Adenocarcinomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1700-1704, 2006/04/20 2006.

QIAGEN, P. miRNeasy Serum/Plasma Handbook. Disponível em: <file:///D:/Downloads/EN-miRNeasy-SerumPlasma-Handbook.pdf >. 2017. Acessado em: 18/05/2017.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 11/print 2013.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-6, Mar 13 2003.

RECZKO, M. et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences. **Bioinformatics**, v. 28, n. 6, p. 771-6, Mar 15 2012.

ROGERS, L. K. et al. Attenuation of miR-17 approximately 92 Cluster in Bronchopulmonary Dysplasia. **Ann Am Thorac Soc**, v. 12, n. 10, p. 1506-13, Oct 2015.

ROUSH, S.; SLACK, F. J. The let-7 family of microRNAs. **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 10, p. 505-16, Oct 2008.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 6, p. e45, Apr 2009.

SARDENBERG, R. A. Estadio Clínico II. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo-SP, Brasil, 2016. p.95-103.

SEIKE, M. et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 29, p. 12085-90, Jul 21 2009.

SENGUPTA, S.; HARRIS, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 44-55, 2005.

SHARMA, S. V. et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 3, p. 169-181, 2007.

SHAW, A. T. et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 26, p. 4247-53, Sep 10 2009.

SHEPHERD, F. A. et al. Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 2, p. 123-132, 2005/07/14 2005.

SHI, B. et al. Analysis of plasma microRNA expression profiles revealed different cancer susceptibility in healthy young adult smokers and middle-aged smokers. **Oncotarget**, v. 7, p. 21676 - 21685, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. v. 68, n. 1, p. 7-30, Jan 2018.

SIGMA-ALDRICH. Sample Purification and Quality Assessment. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sample-purification-and-quality-assessment.html> >. 2017. Acessado em: 20/05/2017.

SODA, M. et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. **Nature**, v. 448, n. 7153, p. 561-566, 2007.

SONG, Y. et al. Circulating or tissue microRNAs and extracellular vesicles as potential lung cancer biomarkers: a systematic review. **Int J Biol Markers**, v. 33, n. 1, p. 3-9, Jan 2018.

STEELES, E. et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 18, n. 4, p. 705-719, October 1, 2001.

STELIGA, M. A.; DRESLER, C. M. Epidemiology of lung cancer: smoking, secondhand smoke, and genetics. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 20, n. 4, p. 605-18, Oct 2011.

SUN, J. et al. Comparative genomic analysis reveals evolutionary characteristics and patterns of microRNA clusters in vertebrates. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 383-91, Jan 10 2013.

SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. Lung cancer in never smokers [mdash] a different disease. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 10, p. 778-790, 2007.

TAKAMIZAWA, J. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Res**, v. 64, n. 11, p. 3753-6, Jun 01 2004.

TAM, I. Y. S. et al. Distinct Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutation Patterns in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Different Tobacco Exposure and Clinicopathologic Features. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1647, 2006.

TERRA, R. M. Estadio Clínico IIIA. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo - SP, Brasil, 2016. p.115-131.

TRAVIS, W. D. et al. **World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics: Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart**. Lyon - IARC Press: 12-15 p. 2004.

TRAVIS, W. D. 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**, v. 10, n. 9, p. 1243-60, Sep 2015.

TRAVIS, W. D.; REKHTMAN, N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 1, p. 22-31, Feb 2011.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 654-9, Jun 2007.

VAN DER VAART, M.; PRETORIUS, P. J. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 1-2, p. 26-36, 2010.

VERMA, V.; LAUTENSCHLAEGER, T. MicroRNAs in non-small cell lung cancer invasion and metastasis: from the perspective of the radiation oncologist. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 16, n. 7, p. 767-74, Jul 2016.

VESCOVO, V. D.; DENTI, M. A. microRNA and Lung Cancer. In: SANTULLI, G. (Ed.). **microRNA: Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. cap. 9, p.153-177.

WARNER, K. E.; MENDEZ, D. Tobacco control policy in developed countries: Yesterday, today, and tomorrow. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 12, n. 9, p. 876-887, 2010.

WEI, Q. et al. Reduced DNA Repair Capacity in Lung Cancer Patients. **Cancer Research**, v. 56, n. 18, p. 4103-4107, September 15, 1996 1996.

WEIBEL, E. R. What makes a good lung? **Swiss Med Wkly**, v. 139, n. 27-28, p. 375-86, Jul 11 2009.

WHEELER, B. M. et al. The deep evolution of metazoan microRNAs. **Evol Dev**, v. 11, n. 1, p. 50-68, Jan-Feb 2009.

WHO, W. H. O. Câncer. Disponível em: < <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> >. 2018. Acessado em:

WONG, N.; WANG, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D146-52, Jan 2015.

WYNDER, E. L.; GRAHAM, E. A. Tobacco Smoking as a Possible Etiologic Factor in Bronchiogenic Carcinoma - A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases. **JAMA**, v. 143, p. 329-336, 27/05/1950 1950.

WYNDER, E. L.; HOFFMANN, D. Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. **Cancer Res**, v. 54, n. 20, p. 5284-95, Oct 15 1994.

XIAO, C. et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. **Nat Immunol**, v. 9, n. 4, p. 405-14, Apr 2008.

XIE, Y. et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 67, n. 2, p. 170-176, 2010.

YANAIHARA, N. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 189-198, 3// 2006.

YANG, J. S. et al. Serum miR-152, miR-148a, miR-148b, and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening. **Tumour Biol**, v. 36, n. 4, p. 3035-42, Apr 2015.

YANG, Y. et al. Application of serum microRNA-9-5p, 21-5p, and 223-3p combined with tumor markers in the diagnosis of non-small-cell lung cancer in Yunnan in southwestern China. **Onco Targets Ther**, v. 11, p. 587-597, 2018.

YOUNES, R. N. Estadiamento de Câncer de Pulmão. In: YOUNES, R. N. (Ed.). **Câncer de Pulmão**. São Paulo-SP, Brasil, 2016. p.61-71.

YUXIA, M.; ZHENNAN, T.; WEI, Z. Circulating miR-125b is a novel biomarker for screening non-small-cell lung cancer and predicts poor prognosis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 12, p. 2045-50, Dec 2012.

ZAAROUR, M. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibitors in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 16, n. 8, p. 877-83, Aug 2016.

ZAGRYAZHSKAYA, A.; ZHIVOTOVSKY, B. miRNAs in lung cancer: A link to aging. **Ageing Research Reviews**, n. 0,

ZHANG, J.-G. et al. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 11, p. 846-852, 2010/06/03/2010.

ZHANG, L. et al. Cigarette Smoke Mediates Nuclear to Cytoplasmic Trafficking of Transcriptional Inhibitor Kaiso through MUC1 and P120-Catenin. **Am J Pathol**, v. 186, n. 12, p. 3146-3159, Dec 2016.

ZHU, S. et al. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). **J Biol Chem**, v. 282, n. 19, p. 14328-36, May 11 2007.

APÊNCIDE A – CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DOS PACIENTES COM CPCNP.

Pacientes CPCNP	Faixa etária	Sexo	Exposição ao tabaco	Subtipo histológico	Estadio TNM
P01	52	F	Fumante	AD	IV
P02	53	F	Fumante	AD	IIIA
P03	80	M	Ex-fumante	AD	IIIB
P04	57	M	Fumante	AD	IIIB
P05	58	M	Fumante	CE	IIIB
P06	60	M	Fumante	AD	IV
P07	74	M	Fumante	AD	IIA
P08	56	F	Fumante	AD	IA
P09	64	M	Fumante	AD	IV
P10	55	F	Ex-fumante	AD	IIIB
P11	68	M	Ex-fumante	AD	IB
P12	77	M	Ex-fumante	AD	IV
P13	62	F	Fumante	CE	IV
P14	67	M	Ex-fumante	AD	IV
P15	55	M	Não-fumante	AD	IV
P16	83	M	Fumante	CE	IIIA
P17	58	F	Fumante	AD	IA
P18	59	M	Fumante	CE	IV
P19	70	M	Fumante	AD	IIIB
P20	64	M	Fumante	CE	IIIB
P21	61	M	Fumante	AD	IB
P22	68	M	Fumante	AD	IIA
P23	76	F	Fumante	AD	IIIA
P24	73	M	Fumante	AD	IIA
P25	63	M	Fumante	AD	IV
P26	83	F	Não fumante	AD	IIIB
P27	57	M	Não fumante	AD	IV
P28	61	F	Fumante	AD	IIIA
P29	72	F	Fumante	AD	IIIA
P30	68	M	Fumante	CE	IIA
P31	71	M	Passivo	AD	IA
P32	74	F	Fumante	AD	IB
P33	84	F	Fumante	AD	IA
P34	66	M	Ex-fumante	AD	IV
P35	84	M	Fumante	CE	IV
P36	60	M	Passivo	AD	IB

AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma escamoso; CPCNP, câncer de pulmão de células não pequenas; F, feminino; M, masculino; P, paciente.

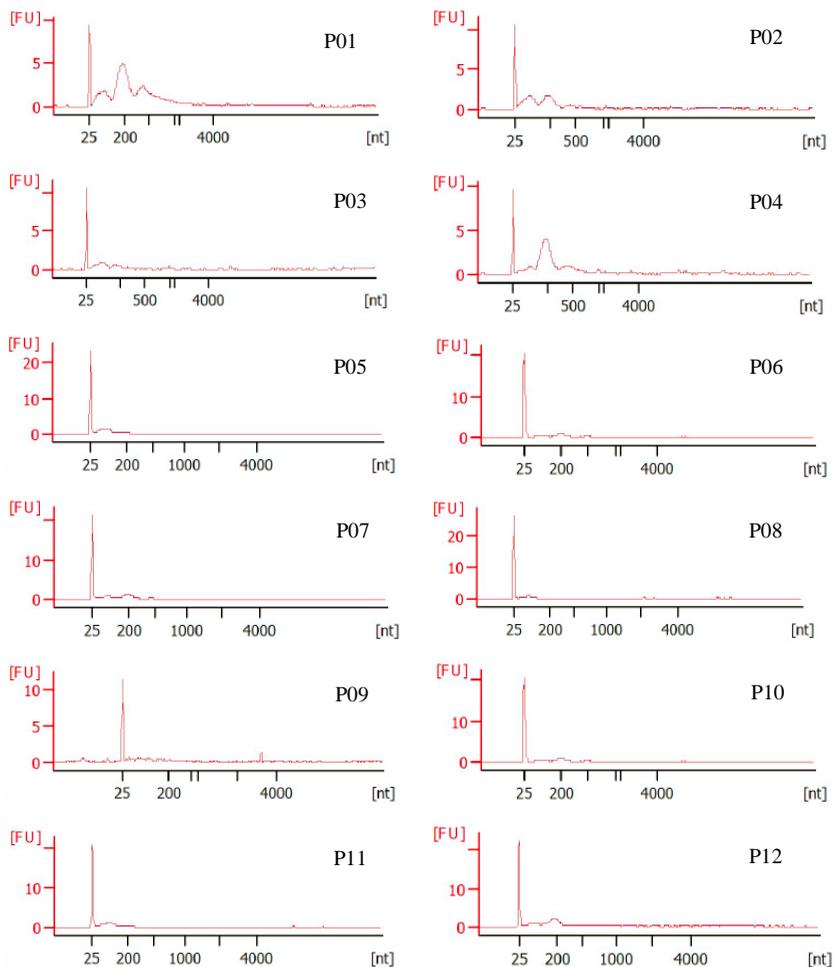
**APÊNCIDE B – CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DO GRUPO
CONTROLE COMPREENDENDO POR INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS NÃO FUMANTES.**

Controle não fumante	Faixa etária	Sexo
C01	50	F
C02	54	F
C03	51	M
C04	52	F
C05	58	F
C06	52	M
C07	56	M
C08	54	M
C09	57	F
C10	56	F
C11	61	F
C12	58	F
C13	58	F
C14	70	M
C15	58	M

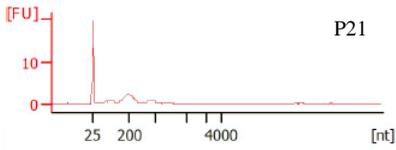
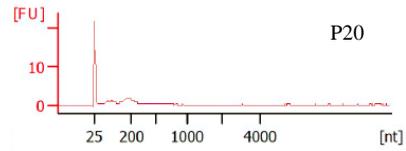
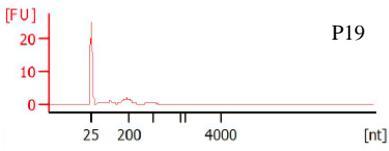
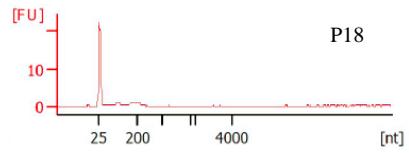
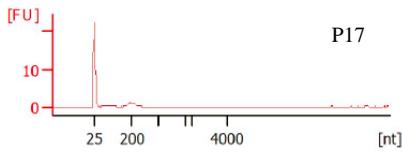
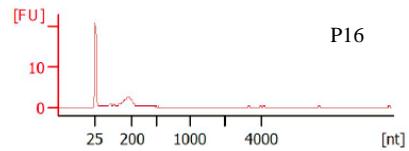
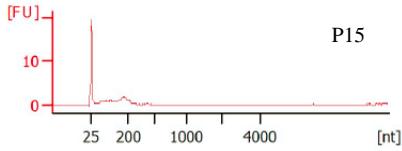
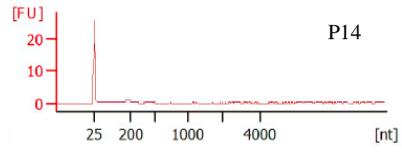
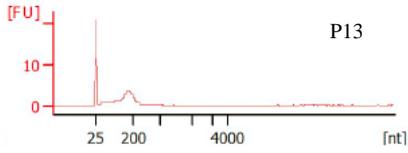
C, controle; F, feminino; M, masculino

APÊNCIDE C – ELETROFEROGRAMAS DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL DESTE ESTUDO (QUADRO 1 – PACIENTES COM CPCNP E QUADRO 2 – INDIVÍDUOS CONTROLE).

Quadro 1

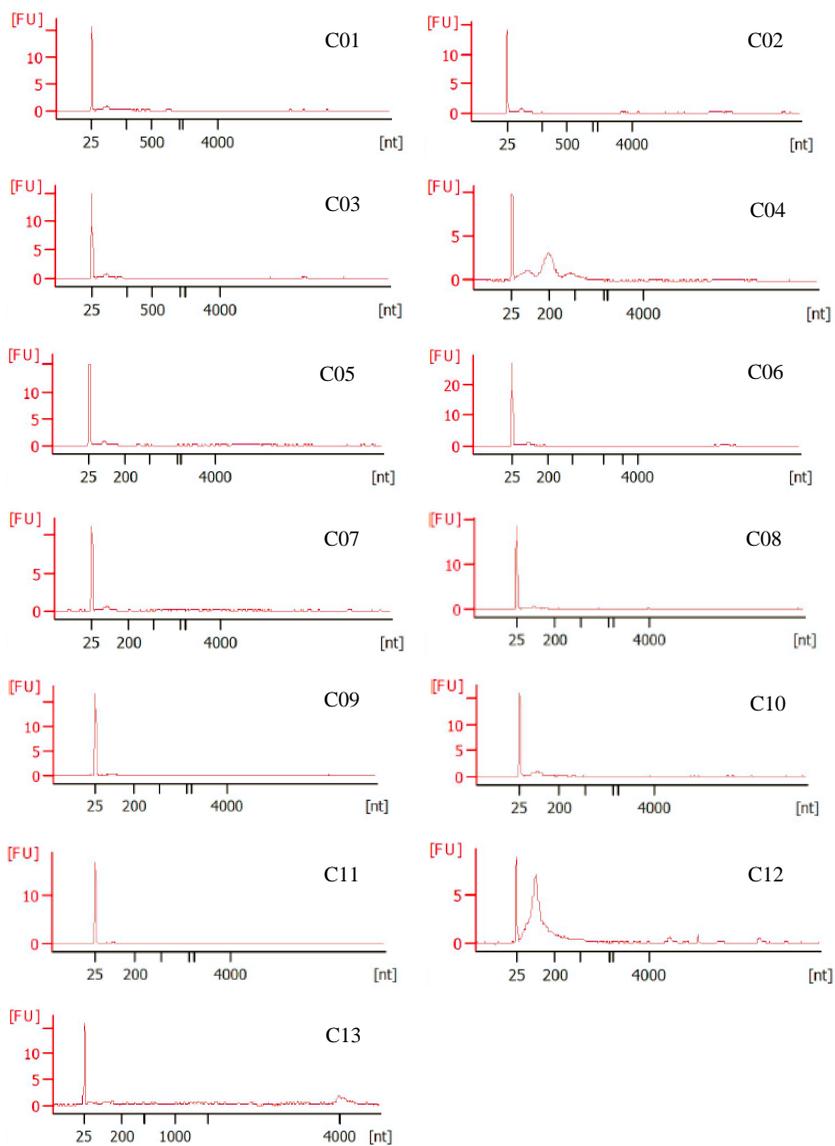


Continuação Quadro 1



FU: unidade de fluorescência; [nt]: nucleotídeo.

Quadro 2



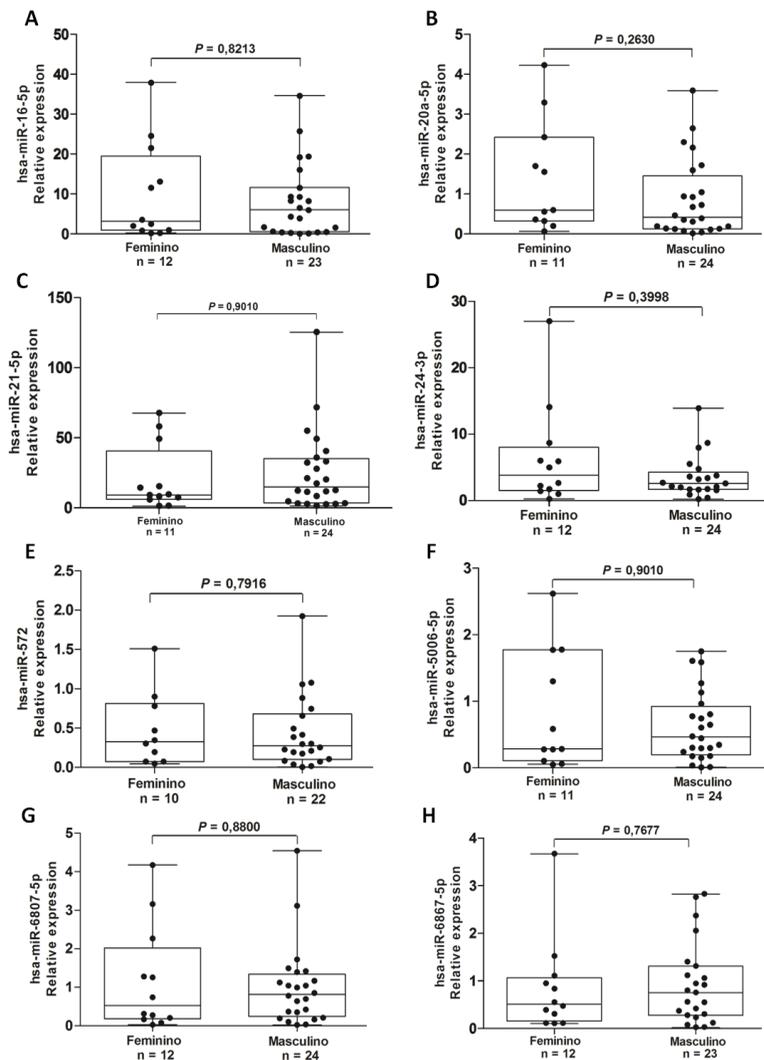
FU: unidade de fluorescência; [nt]: nucleotídeo.

**APÊNCIDE D – CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DO GRUPO
CONTROLE COMPREENDIDO POR INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS FUMANTES.**

Controle fumante	Sexo	Faixa etária
CF01	F	34
CF02	M	32
CF03	F	26
CF04	F	21
CF05	F	29
CF06	M	28
CF07	F	20
CF08	F	23
CF09	M	27
CF10	M	23
CF11	F	20
CF12	F	23
CF13	F	23
CF14	M	20
CF15	M	25

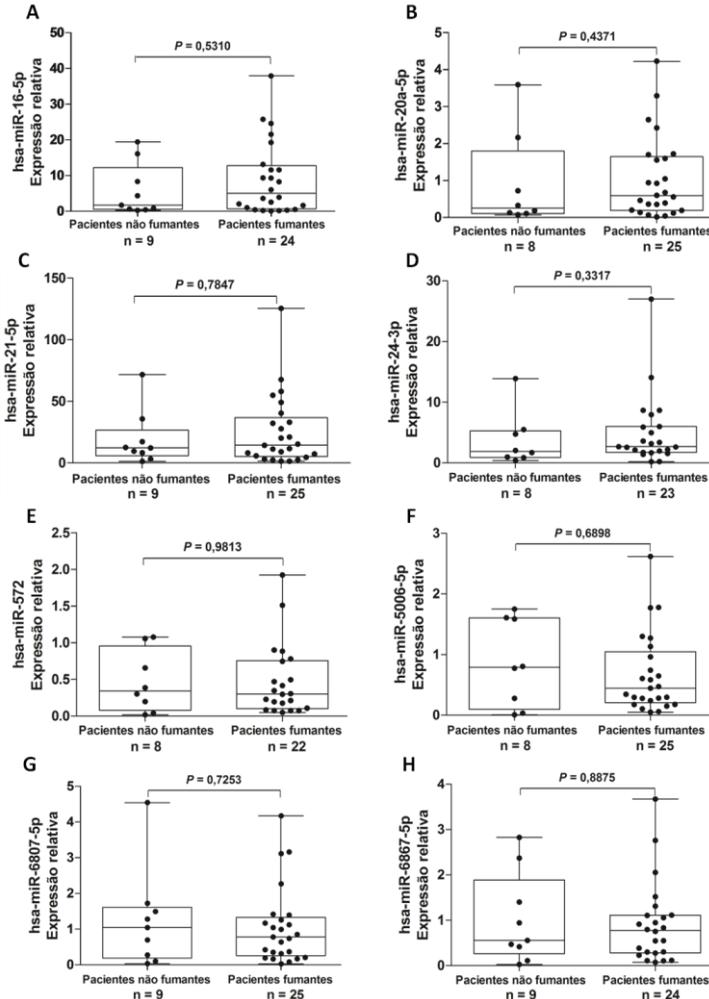
CF, controle fumante; F, feminino; M, masculino

APÊNCIDE E – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO AO SEXO DOS PACIENTES COM CPCNP.



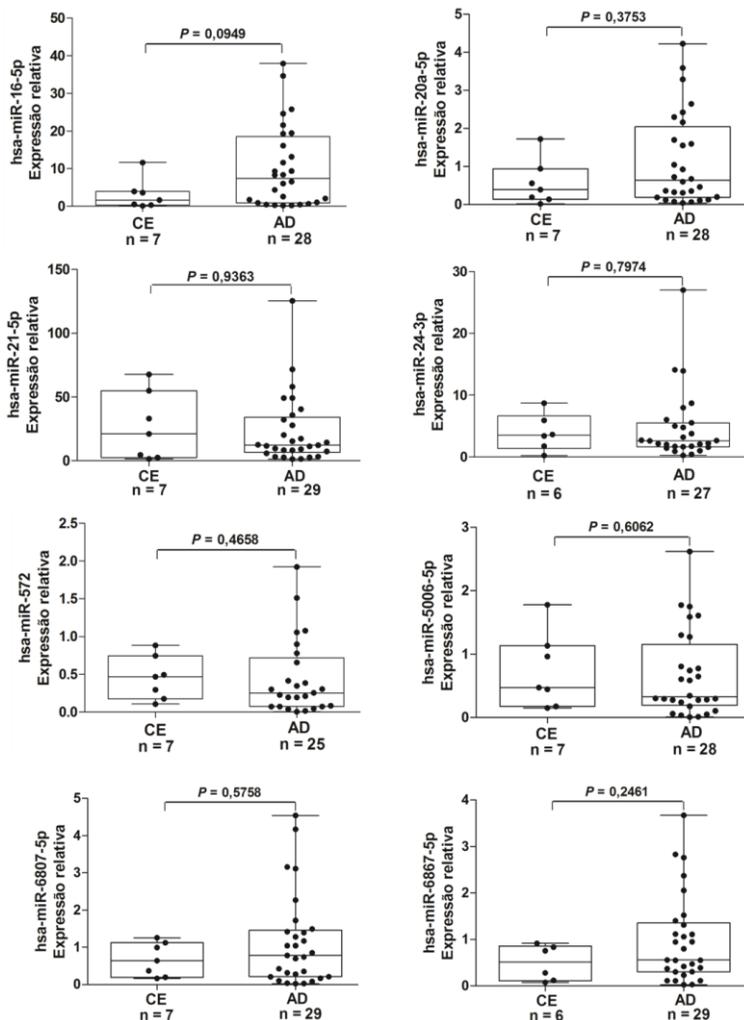
O número de cada participante está demonstrado no gráfico. Os valores de p indicam a diferença estatística entre os grupos comparados (Feminino \times Masculino). Teste de Mann-Whitney U.

APÊNDICE F – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO AO TABACO NOS PACIENTES COM CPCNP.



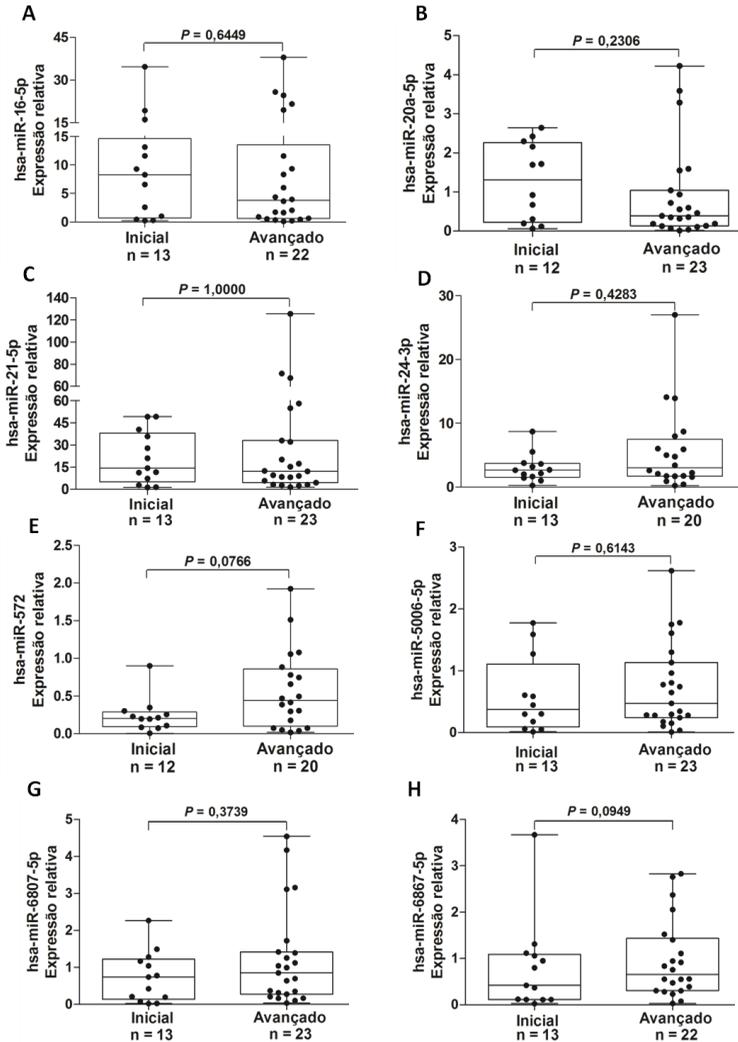
O número de cada participante está demonstrado no gráfico. Os valores de p indicam a diferença estatística entre os grupos comparados (Pacientes com CPCNP não fumantes \times Pacientes com CPCNP fumantes). (Teste de Mann-Whitney U).

APÊNCIDE G – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO AOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO CPCNP NOS PACIENTES ACOMETIDOS PELA DOENÇA.



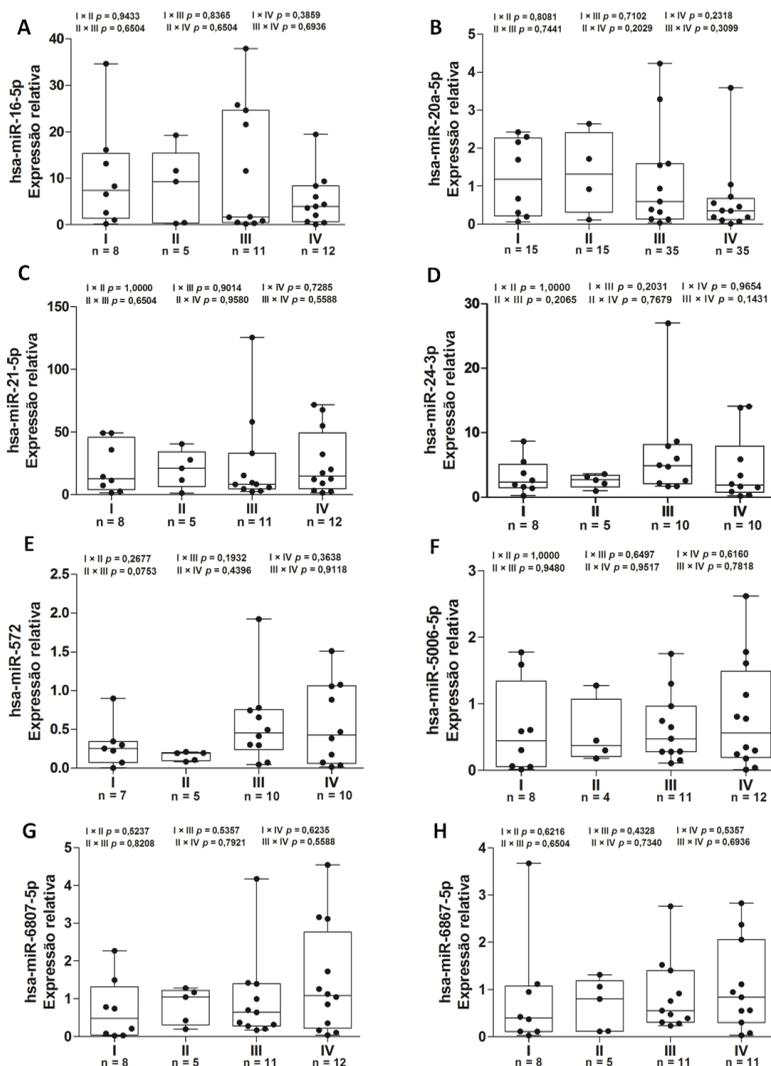
O número de cada participante está demonstrado no gráfico. Os valores de p indicam a diferença estatística entre os grupos comparados (Carcinoma escamoso (CE) × Adenocarcinoma (AD)). (Teste de Mann-Whitney U).

APÊNDICE H – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO À AOS ESTÁDIOS DA DOENÇA NOS PACIENTES COM CPCNP.



O número de cada participante está demonstrado no gráfico. Os valores de p indicam a diferença estatística entre os grupos comparados (Pacientes com CPCNP estadio inicial × Pacientes com CPCNP estadio avançado). (Teste de Mann-Whitney U).

APÊNCIDE I – EXPRESSÃO RELATIVA DOS MIRNAS SELECIONADOS (A – H) EM RELAÇÃO À AOS ESTÁDIOS TNM I A IV NOS PACIENTES COM CPCNP.



O número de cada participante está demonstrado no gráfico. Os valores de p indicam a diferença estatística entre os grupos comparados (I × II, I × III, I × IV, II × III, II × IV, III × IV). (Teste de Mann-Whitney U).

ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de pesquisa: Investigação de miRNAs como biomarcadores diagnósticos para o câncer de pulmão

Os pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina e do Hospital de Caridade estão desenvolvendo este projeto colaborativo, sob a coordenação da Professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, para estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas doenças torácicas. Esse projeto visa fornecer bases para o desenvolvimento de diagnósticos mais precisos para propiciar estratégias terapêuticas mais eficazes para o combate à doença.

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo na qualidade de voluntário. Você tem toda a liberdade em decidir se deseja participar ou não do mesmo. Não há nenhuma consequência negativa, caso você decida não participar.

Caso você concorde em participar do estudo, necessitaremos da sua autorização para acessar seu prontuário médico hospitalar, bem como utilizar uma pequena parte da amostra do material já retirado para a biópsia de tecido e da coleta de soro para a realização do diagnóstico.

Quanto à coleta do tecido, serão retirados fragmentos da lesão endobrônquica conforme procedimento normal de rotina para biópsia. Os riscos associados serão exclusivos ao procedimento de biópsia, que é uma cirurgia indicada pelo médico responsável em função do quadro clínico do paciente. Eventualmente, pode ocorrer sangramento no local e nas lesões periféricas com risco de pneumotórax. Após o exame, o paciente permanecerá em recuperação pós-anestésica sendo avaliado para alta hospitalar ou retorno ao setor que está internado. A coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e complicações em virtude deste procedimento são raras e de pequeno porte, mas existe a possibilidade de leve sensação de dor no local decorrente da punção, bem como a formação de hematoma que desaparece em poucos dias. Em ambos os processos a equipe terá todos os cuidados para evitar qualquer desconforto para o paciente durante os procedimentos em questão. Se isso acontecer, a equipe tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Salientamos que a sua participação neste projeto pode beneficiar futuramente pacientes com câncer de pulmão, uma vez que biomarcadores como os miRNAs quando detectados precocemente podem propiciar uma abordagem terapêutica antecipada, como também podem ser úteis na recidiva da doença, sobrevida e resposta terapêutica.

Nenhum nome ou endereço será associado com a amostra coletada, tornando sua participação confidencial. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

As amostras biológicas serão utilizadas apenas pelos pesquisadores envolvidos neste Projeto.

Não haverá nenhum benefício médico para os participantes do estudo.

Os dados e registros pessoais dos participantes serão mantidos em sigilo no Hospital de Caridade e somente os pesquisadores diretamente relacionados ao projeto terão acesso aos mesmos. Você será informado(a) dos resultados ao final da pesquisa. Além do mais, em qualquer momento e por qualquer circunstância você tem toda liberdade de contatar o coordenador do projeto para requerer informações adicionais ou mesmo requerer sua saída do estudo. Os resultados científicos gerados com essa pesquisa serão disponibilizados para domínio público por meio de publicações de teses e artigos científicos.

Não serão realizados procedimentos além dos acordados previamente com o paciente, nem haverá nenhum risco para o paciente resultante especificamente deste estudo. Além disso, o paciente terá acompanhamento médico durante e após a coleta das amostras biológicas.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Laboratório GEIMM, Campus Universitário, Rua Delfino Conti s/n, CCS, Bloco H, 4º andar, Trindade, Florianópolis – SC, (48) 3721-2212 ou ao Comitê de Ética Em Pesquisa Com Seres Humanos da UFSC que se encontra no Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400, e- mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: + 55 48 3721-6094

APRESENTAM-SE ABAIXO OS TERMOS DA DECLARAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO DESTES ESTUDO:

Eu _____ (nome), portador da CI _____ (nº e órgão emissor) _____, CPF _____, autorizo a utilização de uma amostra da biópsia e/ou da excisão cirúrgica para remoção do tumor do pulmão, bem como uma pequena amostra de soro, para o desenvolvimento de estudos referentes ao projeto de pesquisa “Investigação de miRNAs como biomarcadores diagnósticos para o câncer de pulmão” a ser realizado na Universidade Federal de Santa Catarina com colaboração do Hospital de Caridade em Florianópolis nos termos descritos acima. Durante a entrevista, recebi informações sobre o estudo acima e me senti completamente esclarecido quanto aos objetivos do trabalho. Li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa, além disso entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que uma via deste documento ficará com o responsável pela pesquisa. Estou ciente de que a participação no projeto é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família/tutelado legal. Sei ainda que em qualquer momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação sem que isso traga prejuízo ao meu tratamento. Além disso, ficou claro que serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação da pesquisa podendo ser encaminhado para o Hospital de Caridade sem ônus financeiro.

Paciente ou representante legal

Data

O estudo será realizado na Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis – SC, especificamente no Laboratório GEIMM, Campus Universitário, Rua Delfino Conti s/n, CCS, Bloco H, 4º andar, Trindade, Florianópolis

– SC, (48) 3721-2212, sob a coordenação da Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, cujo endereço é Rodovia Haroldo Soares Glavan, 3522, casa 213, Condomínio Marina Del Rey, Cacupé, Florianópolis, SC, (48) 3733-5451 e 8406-6658, tania.pasa@ufsc.br. Os pesquisadores, abaixo assinados se comprometem com a privacidade das informações realizadas no âmbito da pesquisa e com o cumprimento das ações acima citadas.

Ainda, o Comitê de Ética Em Pesquisa Com Seres Humanos da UFSC encontra-se no Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400, e- mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: + 55 48 3721-6094.

Médico Responsável

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Pesquisadora Responsável pelo estudo
CPF 551695540-87

Data