

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Análises para identificar potenciais biomarcadores de microRNAs no diagnóstico de pacientes com câncer de pulmão em diferentes estágios

**JOÃO VICTOR HAMAMURA TOLOI**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ROGÉRIO ANTÔNIO DE OLIVEIRA**

**COORIENTADORA: BETHINA DA ROCHA CAMARGO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP**

**2023**

T653a

Toloi, João Victor Hamamura

Análises para identificar potenciais biomarcadores de microRNAs no diagnóstico de pacientes com câncer de pulmão em diferentes estágios / João Victor Hamamura Toloi.

-- Botucatu, 2023

30 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Rogério Antônio de Oliveira

Coorientadora: Bethina da Rocha Camargo

1. Câncer. 2. Linguagem de programação (Computadores). 3. Bioestatística. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais José Ricardo Toloí e Ana Cláudia Hamamura por sempre terem me apoiado e me guiado até eu conseguir seguir meu próprio caminho. Agradeço também aos meus avós João Hamamura, Sumie Tanaka, Vanderlei Toloí e Terezinha Toloí, eles foram muito importantes para a minha vida e são exemplos que me motivam muito. Obrigado a todos vocês por me apoiarem e estarem ao meu lado ajudando nessa realização. Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Antônio de Oliveira e coorientadora Bethina da Rocha Camargo pela oportunidade e ajuda sempre que foi necessário, além de todo o conhecimento adquirido durante o projeto. A todos os professores da UNESP/IBB pelas contribuições na qualificação. Agradeço também a Fundibio por financiar o projeto.

## RESUMO

Este estudo aborda a relação entre câncer de pulmão e microRNAs. Dentre os subtipos o adenocarcinoma pulmonar é o mais comum. Os miRNAs são moléculas que desempenham um papel vital na regulação gênica e podem ser úteis no diagnóstico e prognóstico da doença ao explorar suas expressões em tecidos normais e tumorais, bem como em estágios iniciais e avançados. Utilizando dados do The Cancer Genome Atlas, a análise bioinformática foi conduzida no ambiente RStudio. Foram identificados miRNAs significativamente diferenciados, destacando sua potencial relevância como biomarcadores. Análises de sobrevivência evidenciaram associações entre expressões de miRNAs e a sobrevivência dos pacientes. A análise de vias moleculares revelou conexões fundamentais, especialmente nas vias do TGF-beta, citoesqueleto de actina, biossíntese de glicanos e sinalização ERBB. Esses resultados contribuem para a compreensão da complexidade molecular do câncer de pulmão, identificando biomarcadores promissores para diagnóstico e prognóstico.

**Palavras-chave:** Câncer; Linguagem de programação (Computadores); Bioestatística

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -Boxplot e Histograma da Idade e dos Dias dos pacientes com LUAD. Obs: Boxplot – Idade (a); Boxplot – Dias (b); Histograma – Idade (c); Histograma – Dias (d)..... | 13 |
| Figura 2 - Boxplot normal / tumoral miR-21-5p.....                                                                                                                          | 15 |
| Figura 3 - Boxplot normal / tumoral miR-21-3p.....                                                                                                                          | 15 |
| Figura 4 - Boxplot normal / tumoral miR-210-3p.....                                                                                                                         | 15 |
| Figura 5 - Boxplot normal / tumoral miR-301a-5p.....                                                                                                                        | 15 |
| Figura 6 - Boxplot normal / tumoral miR-183-5p.....                                                                                                                         | 16 |
| Figura 7 - Boxplot normal / tumoral miR-409-5p.....                                                                                                                         | 16 |
| Figura 8 - Boxplot inicial / avançado miR-1911-5p.....                                                                                                                      | 16 |
| Figura 9 - Boxplot inicial / avançado miR-216a-5p.....                                                                                                                      | 16 |
| Figura 10 - Boxplot inicial / avançado miR-3687.....                                                                                                                        | 17 |
| Figura 11 - Boxplot inicial / avançado miR-10b-5p.....                                                                                                                      | 17 |
| Figura 12- Boxplot inicial / avançado miR-6777-5p.....                                                                                                                      | 17 |
| Figura 13- Boxplot inicial / avançado miR-217-5p.....                                                                                                                       | 17 |
| Figura 14 - Análise de sobrevivência grupo A e grupo B.....                                                                                                                 | 18 |
| Figura 15 -Análise de sobrevivência do miR-5703.....                                                                                                                        | 19 |
| Figura 16 - Análise de sobrevivência do miR-330-3p.....                                                                                                                     | 19 |
| Figura 17 - Análise de sobrevivência do miR-5187-5p.....                                                                                                                    | 19 |
| Figura 18 - Análise de sobrevivência do miR-1247-3p.....                                                                                                                    | 19 |
| Figura 19 - Análise de sobrevivência do miR-4661-5p.....                                                                                                                    | 19 |
| Figura 20 - Análise de sobrevivência do miR-34b-3p.....                                                                                                                     | 19 |
| Figura 21 - Análise de sobrevivência do miR-4999-5p.....                                                                                                                    | 20 |
| Figura 22 - Análise de sobrevivência do miR-183-3p.....                                                                                                                     | 20 |
| Figura 23 - Vias biológicas relacionadas aos microRNAs mais significativos da Tabela 3. Fonte: DIANA TOOLS.....                                                             | 21 |
| Figura 24 - Vias biológicas relacionadas aos microRNAs mais significativos da Tabela 4. Fonte: DIANA TOOLS.....                                                             | 22 |
| Figura 25 - Vias biológicas relacionadas aos microRNAs mais significativos da Tabela 5. FONTE: DIANATOOLS.....                                                              | 23 |
| Figura 26 - Diagrama de Venn TGF / Citoesqueleto. Fonte: Autor.....                                                                                                         | 24 |
| Figura 27 - Diagrama de Venn Glicanos / TGF / hippo. Fonte: Autor.....                                                                                                      | 24 |
| Figura 28 - Diagrama de Venn Proteoglicanos / ERBB. Fonte: Autor.....                                                                                                       | 25 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Estatísticas descritivas das variáveis clínicas qualitativas dos pacientes com LUAD ..... | 12 |
| Tabela 2 - Estatísticas descritivas das variáveis clínicas quantitativas dos pacientes com LUAD..... | 12 |
| Tabela 3 - Teste de Wilcoxon para comparar tecido Normal vs. Tumoral.....                            | 14 |
| Tabela 4 - Teste de Wilcoxon para comparar tumor Inicial vs. Avançado.....                           | 14 |
| Tabela 5 - MicroRNAs significativos da análise de sobrevivência.....                                 | 18 |

## SUMÁRIO

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>2. METODOLOGIA.....</b>                                 | <b>9</b>  |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>                                  | <b>12</b> |
| 3.1 Análises descritivas.....                              | 12        |
| 3.2 Testes de Wilcoxon Mann-Whitney.....                   | 14        |
| 3.3 Boxplots.....                                          | 15        |
| 3.4 Análises de sobrevivência.....                         | 17        |
| 3.5 Análise das vias dos microRNAs pelo DIANA-miRPath..... | 20        |
| <b>4. DISCUSSÃO.....</b>                                   | <b>25</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                   | <b>27</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                  | <b>27</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem se espalhar para outras regiões do corpo (INCA, 2022).

Mundialmente, o câncer de pulmão é o primeiro tipo de tumor mais comum entre os homens e o terceiro entre as mulheres. A doença também é uma das principais causas de mortes evitáveis, uma vez que 85% dos casos estão relacionadas ao hábito de fumar (Pfizer, 2023).

Em uma visão geral, o câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos: os carcinomas de células pequenas e os carcinomas de células não-pequenas. Dentro desse segundo grupo estão incluídos o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas, o carcinoma de grandes células e os carcinomas neuroendócrinos (INCA, 2023).

O adenocarcinoma pulmonar (LUAD – *Lung adenocarcinoma*) é o caso mais comum encontrado em carcinoma pulmonar de células não pequenas. Ele age principalmente sobre as células glandulares. O tabagismo se mantém como o maior fator de risco para desenvolver essa doença, mas, ao mesmo tempo, é o tipo de câncer de pulmão mais comum em não tabagistas (Oncocenter, 2020).

Os biomarcadores tumorais em sua maioria são proteínas incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios. Esses biomarcadores tumorais são macro-moléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento das células neoplásicas. Essas substâncias funcionam como indicadores da presença de câncer, e podem ser produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença desse tumor (CONTE; FONSECA, 2021).

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codantes, conservados ao longo da evolução, capazes de regular a expressão gênica através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro. A expressão dos miRNAs se apresenta desregulada em diversos processos patológicos, incluindo o câncer (AMARAL et al., 2010).

Recentemente, identificou-se que os microRNAs são regularmente liberados para o meio extracelular, desempenhando um papel crucial na comunicação entre células. Esses microRNAs circulantes, encontrados em diversos fluidos corporais, possuem perfis de



expressão distintos para cada tipo de fluido. A utilização desses microRNAs como marcadores biológicos oferece benefícios associados à notável estabilidade dessas moléculas e à simplicidade na coleta de amostras. (JORGE et al., 2020).

A bioinformática, conforme o “National Human Genome Research Institute” (NHGRI), é uma subdisciplina da biologia e da informática que se encarrega da aquisição, armazenamento, análise e difusão de dados biológicos, majoritariamente sequências de DNA e aminoácidos. Por exemplo, para estudar como se alteram as atividades normais das células durante uma doença, é necessário combinar dados de um grande número de compostos e interpretar as mudanças. Isto diz respeito especialmente às proteínas, as bases da vida (Iberdrola, 2022).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo compreender sobre a relação entre o LUAD e os microRNAs das amostras nos tecidos normais e tecidos tumorais, e também em tecidos com tumor inicial (estágios ia, ib, iia, iib) e tumor avançado (estágios iiia, iiib, iv), seguindo a classificação TNM. Essas análises buscam encontrar microRNAs que, com base na alteração da sua expressão, podem ser utilizados como biomarcadores para a identificação precoce do LUAD e o seu estagiamento.

## 2. METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foi utilizado o banco de dados previamente filtrado e disponibilizado em uma planilha do excel contendo expressões de microRNAs de amostras de pacientes com LUAD e amostras normais adjacentes ao tumor, que foi retirado do “The Cancer Genome Atlas” (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), um programa de referência em genômica do câncer que caracterizou molecularmente mais de 20.000 cânceres primários (NIH, 2021).

O ambiente eleito para conduzir as análises bioinformáticas foi o RStudio, fazendo uso da linguagem de programação R. Ela é uma linguagem de programação de *software* livre, com grande suporte da comunidade. Fornece uma grande variedade de ferramentas para análises estatísticas, construção de gráficos e manipulação de uma grande quantidade de dados (varsomics, 2021).

Inicialmente, realizou-se uma análise descritiva abrangente das variáveis qualitativas e das variáveis quantitativas presentes no banco de dados. Com base nessa análise, foram geradas duas tabelas, proporcionando uma visão panorâmica dos dados e orientando a seleção das comparações a serem exploradas.

O conjunto de dados examinado neste estudo abrange informações relacionadas ao sequenciamento de microRNAs de alto desempenho (miRNA-Seq). Ele é composto por 501 amostras com características histopatologicamente tumorais e 45 amostras com características histopatologicamente normais, somando assim um total de 546 amostras. Ao todo, são consideradas 10 variáveis clínicas (categorias das tabelas 1 e 2), e o conjunto inclui a expressão de 709 microRNAs nessas amostras.

Os estágios dos pacientes com LUAD foram divididos em dois grupos: A, que é composto pelas classes ia, ib, iia e iib do estágio do tumor e referem-se aos estágios iniciais do tumor; B, composto pelos estágios iiia, iiib e iv e referem-se aos estágios avançados do tumor.

As análises de expressão diferencial de microRNAs foram executadas utilizando o teste estatístico de Wilcoxon Mann-Whitney. Ele é uma técnica estatística não paramétrica para comparar duas amostras independentes, adequada quando os dados não seguem uma distribuição normal. O teste busca determinar se as duas amostras têm origens iguais ou se apresentam diferenças estatisticamente significantes. A hipótese nula assume ausência de diferenças nas medianas dos grupos analisados, enquanto a alternativa sugere uma diferença significativa (PIRES et al., 2018).

Adotou-se a hipótese nula como não havendo mudanças significativas na expressão dos microRNAs e a hipótese alternativa como tendo diferença na expressão dos microRNAs. No RStudio, usa-se ‘wilcox.test()’ para realizar o teste, ajustando seus conjuntos de dados conforme necessário.

A compilação dos resultados foi organizada em tabelas que apresentavam todos os microRNAs, destacando apenas aqueles com valores de p inferiores a 0.05 como significativos.

A correção de Bonferroni foi aplicada para aprimorar a confiabilidade dos resultados. Ela é um método para corrigir os valores de testes de hipóteses quando conduzimos vários testes consecutivos (DAMÁSIO, Bruno, 2021).

A correção é feita utilizando um valor de  $\alpha = \text{Erro Tipo I} / m$ , onde m representa o número de comparações. Por exemplo, ao considerar um Erro Tipo I desejado de 5%, um cenário com 5 grupos resultaria em 10 comparações ( $m = 10$ ). O valor de  $\alpha$  para a aceitação ou rejeição de  $H_0$  em cada comparação seria, portanto,  $\alpha=0,005$  ( $0,05 / 10$ ) (USP, 2021).

Para uma compreensão visual mais aprofundada, foram construídos boxplots exibindo a expressão dos microRNAs mais significantes. Esse método proporcionou uma representação gráfica eficaz dos resultados obtidos.

Adicionalmente, uma análise de sobrevivência foi conduzida, estratificando os pacientes com base na expressão dos microRNAs acima ou abaixo da mediana. Esse procedimento visou

agregar informações relevantes aos potenciais biomarcadores, fornecendo clareza a sua relação com a sobrevida dos pacientes.

A análise de sobrevivência é uma abordagem estatística que examina o tempo até a ocorrência de um evento específico, como o diagnóstico de uma doença. Essa análise considera a variável de interesse, o tempo de sobrevivência, desde a entrada no estudo até a falha (evento) ou censura (perda por observação incompleta). No RStudio, o pacote ‘survival’ é comumente empregado. Por meio da função ‘survfit()’, criam-se curvas de sobrevida, e a função ‘survdiff()’ realiza o teste de log-rank para comparar curvas entre grupos (TEIXEIRA; FAERSTEIN; LATORRE, 2002).

O teste de log-rank é uma ferramenta estatística que compara a distribuição do tempo até a ocorrência de um evento entre grupos independentes. O teste considera observações censuradas, onde o tempo real do evento é desconhecido. Ele compara as mortes esperadas e reais ao longo do tempo, usando a estatística de qui-quadrado. A rejeição da hipótese nula indica diferenças nas taxas de eventos entre grupos (GAD et al., 2002).

Por fim foram procuradas as vias em que os microRNAs significativos encontrados nas análises atuam, utilizando o software DIANA-mirPath e pesquisando em artigos atuais (DIANA TOOLS, site: <http://diana.imis.athena-innovation.gr/>).

O DIANA-miRPath é uma plataforma online de análise de microRNA que utiliza interações de microRNA previstas ou experimentalmente comprovadas para explorar os efeitos combinados de microRNA. O DIANA-miRPath inova ao introduzir a capacidade de adaptar seu mecanismo de análise funcional de microRNA, baseado em alvos, a contextos biológicos e/ou experimentais específicos. Para encontrar e ordenar as vias dado um conjunto de microRNAs ele utiliza principalmente duas abordagens estatísticas, o teste exato de Fisher e Distribuições empíricas não enviesadas. Teste de Fisher avalia se a sobreposição entre os alvos de microRNAs e uma via ou termo GO é significativamente maior do que o esperado ao acaso. As Distribuições Empíricas Não Enviesadas superam vieses por meio de simulações, gerando um valor de p com base na proporção de simulações que mostram uma sobreposição semelhante ou maior. Essas abordagens fornecem uma avaliação robusta da influência funcional dos microRNAs em vias biológicas. (TASTSOGLOU et al., (2023).

Essas abordagens metodológicas abrangentes e sistemáticas ofereceram uma base sólida para a identificação e caracterização de potenciais biomarcadores associados ao câncer de pulmão, utilizando análises estatísticas rigorosas, visualizações elucidativas para interpretar os resultados e depois comprovando ou não sua veracidade em artigos científicos recentes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análises descritivas

Os detalhes das variáveis clínicas histopatológicas e as medidas resumo para as variáveis qualitativas e quantitativas estão fornecidos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Estatísticas descritivas das variáveis clínicas qualitativas dos pacientes com LUAD

| <b>Categoria</b>                 | <b>Descrição</b>                            | <b>Quantidade</b> | <b>Porcentagem (%)</b> |
|----------------------------------|---------------------------------------------|-------------------|------------------------|
| <b>Tecido</b>                    | Normal                                      | 45                | 8,24                   |
|                                  | Tumoral                                     | 501               | 91,76                  |
| <b>Sexo</b>                      | F                                           | 291               | 53,3                   |
|                                  | M                                           | 255               | 46,7                   |
| <b>Etnia</b>                     | Asiático                                    | 8                 | 1,47                   |
|                                  | Branco                                      | 417               | 76,37                  |
|                                  | Faltante                                    | 65                | 11,9                   |
|                                  | Negro                                       | 56                | 10,26                  |
| <b>Histologia</b>                | Adenocarcinoma                              | 340               | 62,28                  |
|                                  | Adenocarcinoma com subtipos mistos          | 106               | 19,41                  |
|                                  | Adenocarcinoma mucinoso                     | 14                | 2,56                   |
|                                  | Adenocarcinoma papilar                      | 23                | 4,21                   |
|                                  | Carcinoma bronquiolo-alveolar, não mucinoso | 20                | 3,66                   |
|                                  | Carcinoma de células acinares               | 22                | 4,03                   |
|                                  | Outros                                      | 21                | 3,85                   |
| <b>Classificação</b>             | A                                           | 434               | 79,49                  |
|                                  | B                                           | 112               | 20,51                  |
| <b>Estágio do Tumor</b>          | stage i                                     | 5                 | 0,92                   |
|                                  | stage ia                                    | 148               | 27,11                  |
|                                  | stage ib                                    | 150               | 27,47                  |
|                                  | stage ii                                    | 1                 | 0,18                   |
|                                  | stage iia                                   | 58                | 10,62                  |
|                                  | stage iib                                   | 72                | 13,19                  |
|                                  | stage iiaa                                  | 77                | 14,1                   |
|                                  | stage iiib                                  | 11                | 2,01                   |
|                                  | stage iv                                    | 24                | 4,4                    |
| <b>Estado Vital</b>              | Morto                                       | 196               | 35,9                   |
|                                  | Vivo                                        | 350               | 64,1                   |
| <b>Tecido ou Órgão de origem</b> | Lobo inferior                               | 184               | 33,7                   |
|                                  | Lobo medio                                  | 23                | 4,21                   |
|                                  | Lobo superior                               | 318               | 58,24                  |
|                                  | Outros                                      | 21                | 3,85                   |

*Obs: Na "histologia" "Outros" inclui classes com menos de 7 observações que são: adenocarcinoma de células claras, adenocarcinoma de bronquiolo-alveolar, carcinoma bronquio-alveolar mucinoso, carcinoma de células em anel de sinete, carcinoma micropapilar e carcinoma sólido. Em "Tecido ou Órgão de origem" "Outros" inclui classes com menos de 16 observações que são: bronquio principal, lesão de sobreposição do pulmão e pulmão.*

Tabela 2 - Estatísticas descritivas das variáveis clínicas quantitativas dos pacientes com LUAD

| <b>Categoria</b>    | <b>Média</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>Mínimo</b> | <b>1º Quartil</b> | <b>Mediana</b> | <b>3º Quartil</b> | <b>Máximo</b> |
|---------------------|--------------|----------------------|---------------|-------------------|----------------|-------------------|---------------|
| <b>Idade</b>        | 65,34        | 9,99                 | 38,5          | 58,3              | 65,6           | 72,8              | 88,9          |
| <b>Tempo (dias)</b> | 882,93       | 964,39               | 0             | 379               | 630            | 1088              | 7248          |

Com base nos resultados dessas tabelas, é possível observar amplamente os dados dos indivíduos que fazem parte dessas amostras.

Observou-se que grande parte das amostras são de tecido tumoral (91,76%) e que 35,9% dos pacientes faleceram até o final do estudo. Os gêneros estão bem equilibrado, 53,3% são do sexo feminino e 46,7% são do sexo masculino. A maioria dos pacientes é de etnia branca (76,37%). Todas as classes da histologia são tipos de adenocarcinoma pulmonar e a classe mais comum é a do adenocarcinoma sem mais detalhes em 62,27% dos casos. O Grupo A representando 79,49% dos casos enquanto o Grupo B representa 20,51%. Em relação ao Tecido ou Órgão de origem a maior parte se encontra no lobo superior com 58,24% dos casos.

Na Tabela 2 a idade dos pacientes varia de 38,5 a 88,9 anos com uma média de 65 anos. O tempo (em dias) varia de 0 a 7248 com uma média de ~882 dias.

Para melhor visualização os gráficos referentes a Idade estão em verde e os gráficos referentes aos Dias estão em azul.

O boxplot e o histograma da Idade na Figura 1a e 1c mostra uma distribuição assimétrica da idade, concentrando a maioria dos pacientes na faixa etária de 50 a 80 anos.

Com o boxplot e histograma dos Dias da Figura 1b e 1d observa-se que existe uma grande concentração de pacientes com um acompanhamento entre 300 e 1000 dias.

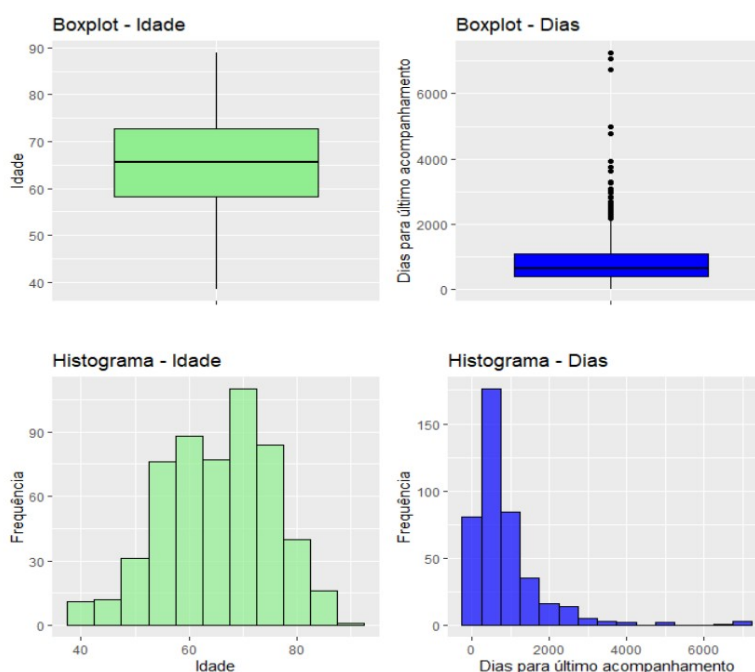


Figura 1- Boxplot e Histograma da Idade e dos Dias dos pacientes com LUAD. Obs:Boxplot – Idade (a); Boxplot – Dias (b); Histograma – Idade (c); Histograma –Dias (d).

### 3.2 Testes de Wilcoxon Mann-Whitney

Foram realizados testes em todos os microRNAs e duas comparações principais foram feitas, a testando se existe diferença entre a expressão dos tecidos normais e tumorais e se existe diferença entre a expressão nos tumores iniciais e avançados. Foram selecionados os que tiveram valor de p significativo ( $p < 0,05$ ). Para a correção de Bonferroni foi considerado o valor de p ( $p = 0,05$ ) e o número total de miRNAs analisados ( $n = 709$ ), usando a fórmula ( $\alpha = p / n$ ) temos que  $\alpha < 0,00007$ . Após essa correção nenhum dos microRNAs da Tabela 4 foi significativo então a fim de comparação foi adotado  $p < 0,05$  como significativo neste caso.

Tabelas com os MicroRNAs mais significativos para o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney com a correção de bonferroni apenas na comparação entre tecido normal e tumoral, ordenados começando pelo menor valor de p e setas ( $\uparrow$  e  $\downarrow$ ) ao lado dos nomes indicando o aumento ou diminuição da expressão de microRNA em relação ao tecido normal e tumor inicial nas tabelas 3 e 4 respectivamente. Tabela 3 com o teste comparando a expressão de microRNA nos tecidos normais e tumorais. Tabela 4 comparando a expressão de microRNA nos tumores iniciais e avançados.

Tabela 3 - Teste de Wilcoxon para comparar tecido Normal vs. Tumoral

| MicroRNAs                   | Tecido Normal |            |        |               |         |            |        | Tecido Tumoral |            |        |               |         |            |         | Valor de p    |
|-----------------------------|---------------|------------|--------|---------------|---------|------------|--------|----------------|------------|--------|---------------|---------|------------|---------|---------------|
|                             | Mínimo        | 1º Quartil | Média  | Desvio Padrão | Mediana | 3º Quartil | Máximo | Mínimo         | 1º Quartil | Média  | Desvio Padrão | Mediana | 3º Quartil | Máximo  |               |
| hsa-miR-21-5p $\uparrow$    | 92566         | 417928     | 458219 | 150709        | 497239  | 561692     | 664743 | 398236         | 680512     | 743168 | 100144        | 745993  | 810386     | 1128308 | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-21-3p $\uparrow$    | 91852         | 162388     | 196568 | 54012         | 197751  | 231538     | 350727 | 142094         | 314780     | 385379 | 101876        | 381078  | 439777     | 744889  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-210-3p $\uparrow$   | 12587         | 41131      | 62345  | 29370         | 59022   | 83579      | 144278 | 20438          | 124017     | 170890 | 59024         | 169604  | 213962     | 343944  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-301a-5p $\uparrow$  | 0             | 0          | 1892   | 5551          | 1       | 2          | 29564  | 0              | 19932      | 37944  | 24454         | 36358   | 54943      | 109677  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-483-5p $\uparrow$   | 148116        | 310735     | 365620 | 99360         | 351098  | 408211     | 597354 | 273073         | 531611     | 622482 | 127795        | 625045  | 713077     | 1003540 | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-409-5p $\uparrow$   | 0             | 1          | 3622   | 6327          | 1       | 9966       | 22575  | 0              | 20946      | 39631  | 25615         | 37113   | 57372      | 135105  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-182-5p $\uparrow$   | 129933        | 301674     | 332617 | 85411         | 332695  | 393419     | 474837 | 223026         | 484310     | 590676 | 159862        | 579098  | 680423     | 1086696 | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-3607-3p $\uparrow$  | 1             | 9967       | 24564  | 24720         | 15665   | 35592      | 100311 | 1              | 68477      | 132255 | 86395         | 119669  | 170918     | 489066  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-29b-1-5p $\uparrow$ | 0             | 2          | 14385  | 16281         | 9968    | 27148      | 53893  | 1              | 44980      | 67633  | 33524         | 67800   | 91922      | 175883  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-33b-5p $\uparrow$   | 0             | 0          | 4751   | 11048         | 1       | 3          | 61771  | 0              | 19934      | 40434  | 25947         | 38234   | 60056      | 123322  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-1287-3p $\uparrow$  | 0             | 1          | 10118  | 13080         | 2       | 15660      | 49162  | 0              | 27190      | 43187  | 22457         | 40625   | 54847      | 119286  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-616-5p $\uparrow$   | 0             | 0          | 1765   | 5288          | 1       | 1          | 29565  | 0              | 9967       | 33004  | 25724         | 31611   | 52142      | 102909  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-577 $\uparrow$      | 0             | 0          | 1899   | 4978          | 0       | 1          | 25625  | 0              | 13682      | 30911  | 24534         | 28179   | 44644      | 139129  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-183-3p $\uparrow$   | 0             | 0          | 444    | 2077          | 1       | 1          | 9967   | 0              | 3          | 28707  | 34030         | 15660   | 45225      | 175743  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-141-3p $\uparrow$   | 1             | 121882     | 130379 | 48492         | 135257  | 159141     | 239545 | 45223          | 186295     | 250843 | 85918         | 239254  | 303336     | 624100  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-147b-3p $\uparrow$  | 0             | 0          | 443    | 2077          | 0       | 1          | 9967   | 0              | 2          | 25612  | 29034         | 15661   | 42716      | 180381  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-4668-3p $\uparrow$  | 0             | 0          | 2682   | 5322          | 1       | 2          | 19599  | 0              | 9969       | 23806  | 16076         | 24955   | 35256      | 65378   | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-629-3p $\uparrow$   | 0             | 1          | 10787  | 13714         | 9966    | 19600      | 52193  | 0              | 25625      | 42419  | 22861         | 40133   | 57587      | 111298  | $P < 0,00001$ |
| hsa-miR-301b-3p $\uparrow$  | 0             | 0          | 665    | 2514          | 0       | 1          | 9968   | 0              | 2          | 18520  | 19169         | 15658   | 29827      | 89665   | $P < 0,00001$ |

Tabela 4 - Teste de Wilcoxon para comparar tumor Inicial vs. Avançado

| MicroRNAs                    | Tumor inicial |            |        |               |         |            |        | Tumor avançado |            |        |               |         |            |        | Valor de p |
|------------------------------|---------------|------------|--------|---------------|---------|------------|--------|----------------|------------|--------|---------------|---------|------------|--------|------------|
|                              | Mínimo        | 1º Quartil | Média  | Desvio Padrão | Mediana | 3º Quartil | Máximo | Mínimo         | 1º Quartil | Média  | Desvio Padrão | Mediana | 3º Quartil | Máximo |            |
| hsa-miR-1911-5p $\downarrow$ | 0             | 0          | 9321   | 19663         | 1       | 15658      | 258129 | 0              | 0          | 3688   | 8168          | 0       | 1          | 51109  | 0,0025     |
| hsa-miR-216a-5p $\downarrow$ | 0             | 1          | 11617  | 15172         | 9966    | 19600      | 134312 | 0              | 0          | 7519   | 10084         | 2       | 10304      | 42805  | 0,0054     |
| hsa-miR-3687 $\downarrow$    | 0             | 0,25       | 8164   | 26178         | 2       | 9967       | 395659 | 0              | 1          | 8976   | 14092         | 3       | 15658      | 65156  | 0,0061     |
| hsa-miR-10b-5p $\downarrow$  | 110812        | 252007     | 332897 | 105901        | 325426  | 401367     | 714691 | 116012         | 213371     | 308859 | 114956        | 293849  | 373132     | 609958 | 0,0088     |
| hsa-miR-6777-5p $\downarrow$ | 0             | 0          | 3645   | 8499          | 1       | 4          | 67797  | 0              | 0          | 2372   | 7692          | 1       | 2          | 69094  | 0,0159     |
| hsa-miR-217-5p $\downarrow$  | 0             | 41068,5    | 65552  | 35373         | 63808   | 87716      | 287143 | 0              | 35129      | 57251  | 28396         | 56397   | 78089      | 149939 | 0,0166     |
| hsa-miR-33a-5p $\downarrow$  | 0             | 26077      | 41394  | 22316         | 38802   | 53793      | 145636 | 0              | 31158      | 46298  | 21752         | 46224   | 61210      | 103024 | 0,0181     |
| hsa-miR-3191-3p $\uparrow$   | 0             | 0          | 3007   | 6544          | 1       | 3          | 45558  | 0              | 1          | 4223   | 8234          | 1       | 9967       | 55190  | 0,0183     |
| hsa-miR-4466 $\uparrow$      | 0             | 0          | 4191   | 10041         | 1       | 1011       | 139844 | 0              | 0          | 5817   | 8485          | 1       | 9967       | 35011  | 0,0183     |
| hsa-miR-885-5p $\downarrow$  | 0             | 0          | 5806   | 10088         | 1       | 9966       | 105518 | 0              | 0          | 4606   | 8709          | 0       | 9966       | 35011  | 0,0191     |
| hsa-miR-192-5p $\uparrow$    | 20734         | 176492     | 219233 | 79830         | 203078  | 240250     | 784820 | 69318          | 191740     | 232282 | 76745         | 216269  | 253378     | 543880 | 0,0202     |
| hsa-miR-3928-3p $\uparrow$   | 0             | 2          | 13280  | 15299         | 9967    | 21751      | 93825  | 0              | 2          | 16662  | 15554         | 15659   | 25624      | 63458  | 0,0255     |
| hsa-miR-155-3p $\uparrow$    | 0             | 0          | 8984   | 12642         | 1       | 15658      | 54064  | 0              | 1          | 11152  | 13099         | 9966    | 18587      | 49721  | 0,0264     |
| hsa-miR-497-3p $\uparrow$    | 0             | 0          | 5766   | 10849         | 1       | 9967       | 77186  | 0              | 1          | 7218   | 9629          | 2       | 9968       | 41283  | 0,0271     |
| hsa-miR-590-3p $\uparrow$    | 0             | 38459      | 54838  | 25019         | 56444   | 73664      | 121509 | 0              | 42647      | 60242  | 27071         | 62997   | 81349      | 116432 | 0,0273     |
| hsa-miR-6802-3p $\downarrow$ | 0             | 0          | 3217   | 6945          | 1       | 3          | 45556  | 0              | 0          | 3141   | 10882         | 1       | 2          | 82798  | 0,0305     |
| hsa-miR-190b-5p $\uparrow$   | 0             | 1          | 10952  | 15056         | 3       | 19088      | 84748  | 0              | 1          | 13871  | 16300         | 9966    | 25046      | 72020  | 0,0381     |
| hsa-miR-541-3p $\downarrow$  | 0             | 0          | 5204   | 10890         | 1       | 9966       | 76339  | 0              | 0          | 3619   | 9970          | 0       | 1          | 56165  | 0,0385     |
| hsa-miR-296-5p $\uparrow$    | 0             | 15658      | 29739  | 23631         | 25048   | 39862      | 136375 | 1              | 18175      | 34409  | 23061         | 30112   | 45798      | 127079 | 0,0393     |
| hsa-miR-450a-5p $\uparrow$   | 0             | 45557,25   | 76572  | 43362         | 78616   | 108269     | 224166 | 0              | 60736      | 86161  | 42327         | 88803   | 118464     | 200920 | 0,0393     |
| hsa-miR-10b-3p $\uparrow$    | 0             | 9967       | 34749  | 31811         | 29567   | 50775      | 232139 | 0              | 2          | 30419  | 33397         | 19935   | 47846      | 189163 | 0,0464     |
| hsa-miR-195-3p $\uparrow$    | 0             | 22628      | 40229  | 22685         | 40626   | 55116      | 101849 | 1              | 29566      | 44194  | 20685         | 45223   | 56449      | 109381 | 0,0477     |
| hsa-miR-5699-3p $\uparrow$   | 0             | 0          | 3352   | 8274          | 1       | 2          | 77116  | 0              | 0          | 3807   | 7425          | 1       | 9966       | 38233  | 0,0495     |

### 3.3 Boxplots

Foram gerados boxplots dos MicroRNAs que obtiveram valor de p significativo nos testes de Wilcoxon (Tabelas 3 e 4) para visualizar melhor a diferença da expressão entre eles.

É possível ver uma maior diferença na expressão de microRNAs nos boxplots entre os tecidos normais e tumorais do que entre os tumores iniciais e avançados. Também consta citar uma maior dificuldade da interpretação dos resultados nos boxplots de tumor inicial e avançado visto que seus gráficos possuem muitos “outliers” e seus resultados são muito próximos.

Abaixo os boxplots referentes aos 6 MicroRNAs com menor valor de p no teste de Wilcoxon na comparação da sua expressão entre os tecidos normais e tecidos tumorais. Tecido normal em azul e tecido tumoral em vermelho, eixo y é a expressão de cada um e eixo x é o tipo do tecido.

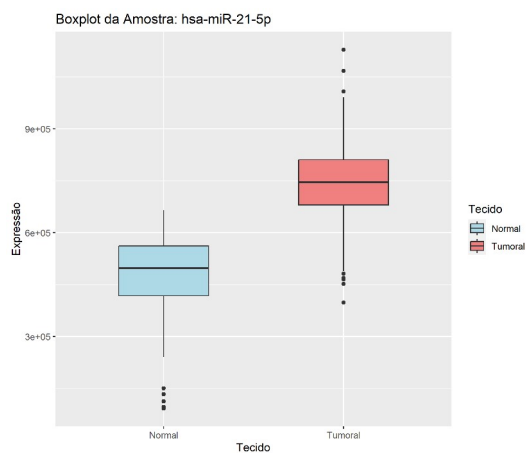


Figura 2 - Boxplot normal / tumoral miR-21-5p

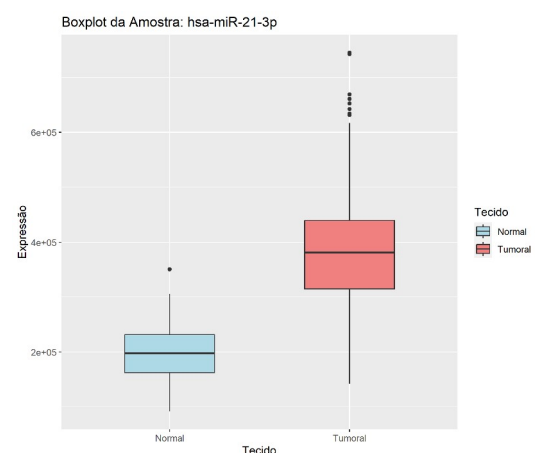


Figura 3 - Boxplot normal / tumoral miR-21-3p

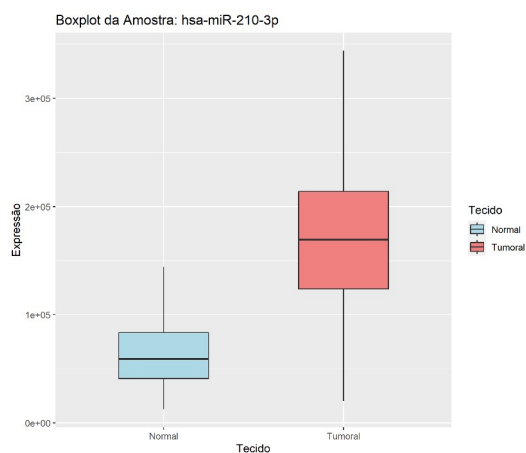


Figura 4 - Boxplot normal / tumoral miR-210-3p

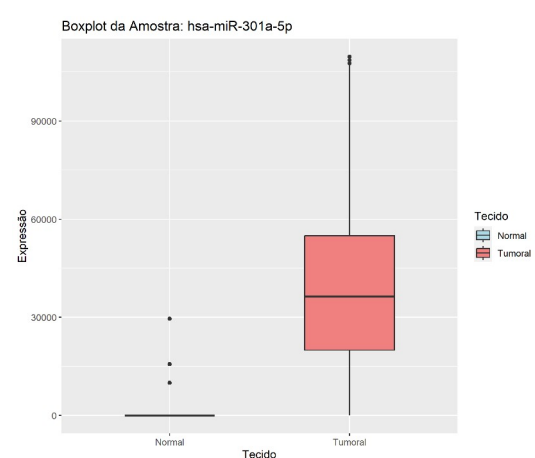


Figura 5 - Boxplot normal / tumoral miR-301a-5p

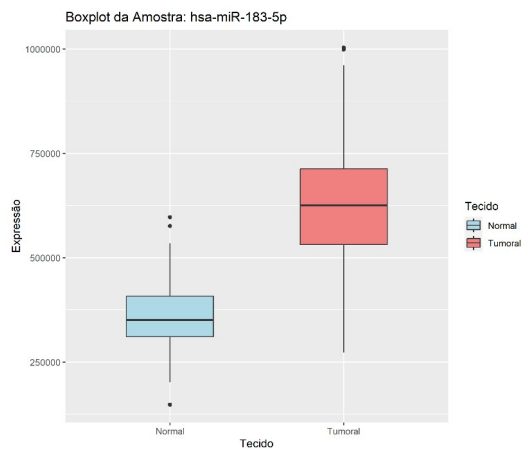


Figura 6 - Boxplot normal / tumoral  
miR-183-5p

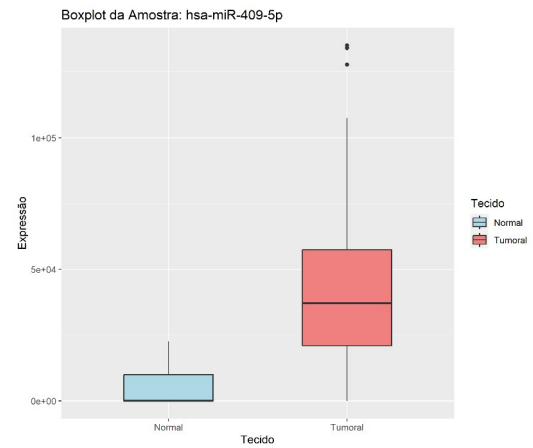


Figura 7 - Boxplot normal / tumoral miR-  
409-5p

Abaixo os boxplots referentes aos 6 MicroRNAs com menor valor de p no teste de Wilcoxon na comparação da sua expressão entre os tumores iniciais e tumores avançados. Tumor inicial em verde e tumor avançado em amarelo, eixo y é a expressão de cada um e eixo x é o estágio do tumor.

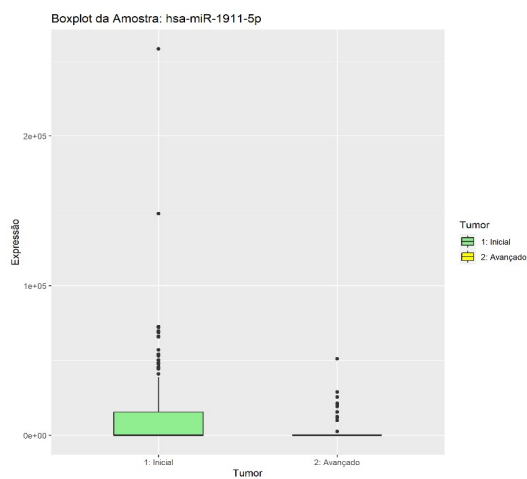


Figura 8 - Boxplot inicial / avançado  
miR-1911-5p

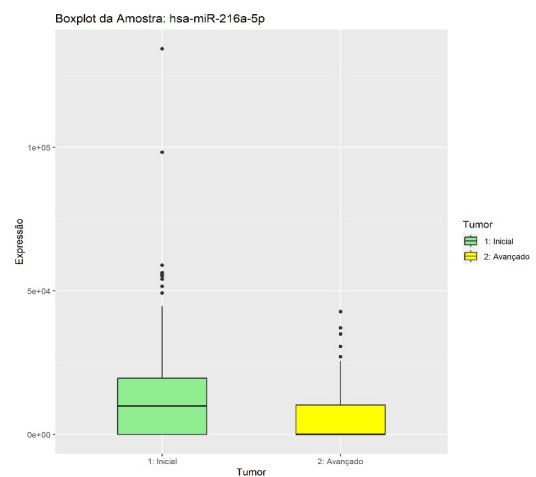


Figura 9 - Boxplot inicial / avançado  
miR-216a-5p



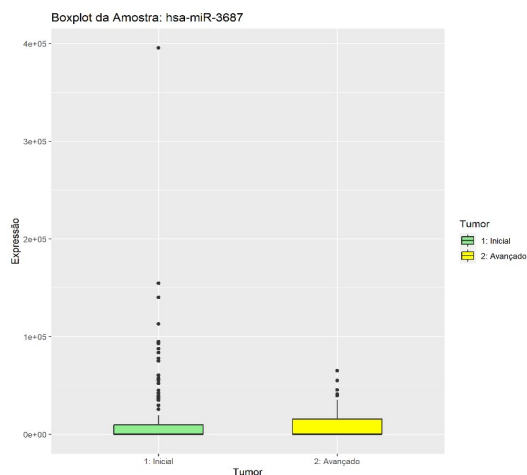


Figura 10 - Boxplot inicial / avançado  
miR-3687

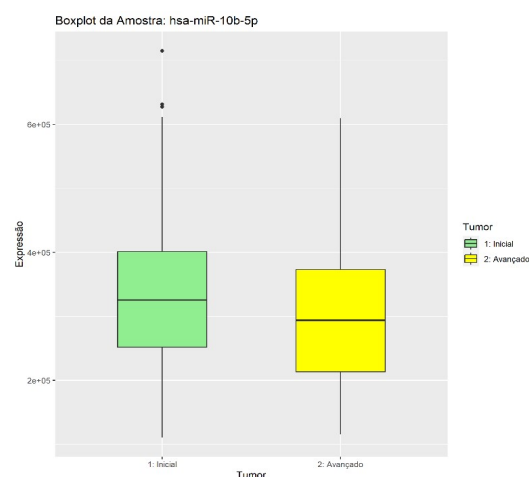


Figura 11 - Boxplot inicial / avançado  
miR-10b-5p

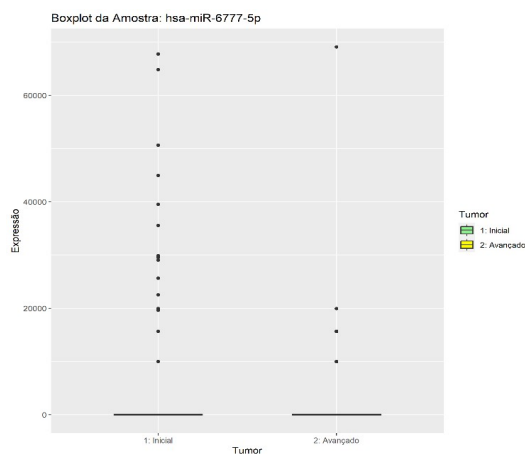


Figura 12- Boxplot inicial / avançado  
miR-6777-5p

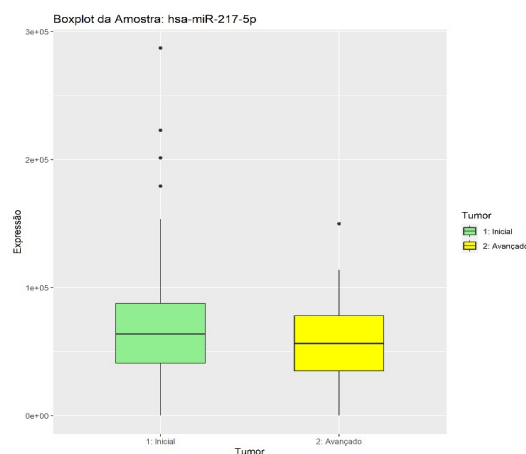


Figura 13- Boxplot inicial / avançado  
miR-217-5p

### 3.4 Análises de sobrevivência

Nas análises de sobrevivência a variável analisada foi o tempo (em dias) até o último acompanhamento do paciente, sendo a variável censura associada ao status de vida do paciente. Este status é atribuído como 1 caso o paciente tenha falecido devido ao câncer de pulmão ( $n = 196$ ) e 0 se o paciente foi perdido durante o estudo por motivos não relacionados ao câncer ( $n = 350$ ). Essa análise foi realizada para todas as 546 amostras presentes no bando de dados dos pacientes com LUAD.

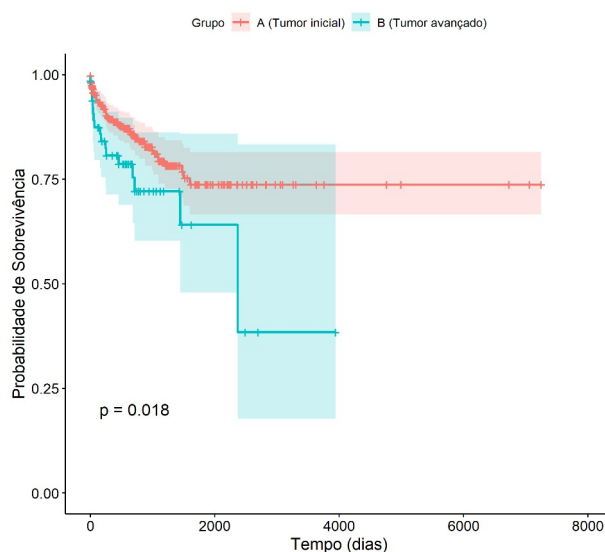


Figura 14 - Análise de sobrevivência grupo A e grupo B

A Figura 14 é uma representação visual dos resultados, o valor de  $p$  significativo, com  $p = 0,018$ , mostra que realmente existe diferença entre os grupos A e B, destacando que o Grupo A evidenciou uma maior taxa de sobrevivência devido à detecção precoce do câncer, enquanto o Grupo B registrou uma maior incidência de mortalidade.

Abaixo (Figuras 15 a 21) os MicroRNAs com os menores valores de  $p$  significativos obtidos pelo teste de log rank usando a mediana da expressão de microRNA como divisão dos grupos. Expressão abaixo da mediana em vermelho e acima da mediana em azul. A diferença das curvas é ~25% em questão a sobrevivência e o miR 4661 é o único dos oito citados que apresenta uma sobrevivência melhor com a sua expressão abaixo da mediana.

Tabela 5 - MicroRNAs significativos da análise de sobrevivência

| miRNA           | Valor de p | miRNA            | Valor de p |
|-----------------|------------|------------------|------------|
| hsa-miR-5703    | 0,0033     | hsa-miR-490-3p   | 0,025      |
| hsa-miR-330-3p  | 0,0042     | hsa-miR-6761-5p  | 0,025      |
| hsa-miR-5187-5p | 0,0073     | hsa-miR-589-5p   | 0,03       |
| hsa-miR-1247-3p | 0,0089     | hsa-miR-135b-3p  | 0,031      |
| hsa-miR-4661-5p | 0,009      | hsa-miR-1301-5p  | 0,034      |
| hsa-miR-34b-3p  | 0,012      | hsa-miR-185-3p   | 0,037      |
| hsa-miR-4999-5p | 0,012      | hsa-miR-331-5p   | 0,037      |
| hsa-miR-183-3p  | 0,019      | hsa-miR-19b-1-5p | 0,04       |
| hsa-miR-451a    | 0,019      | hsa-miR-3942-5p  | 0,043      |
| hsa-miR-6761-5p | 0,021      | hsa-miR-210-5p   | 0,044      |
| hsa-miR-200b-5p | 0,025      | hsa-miR-3940-5p  | 0,049      |

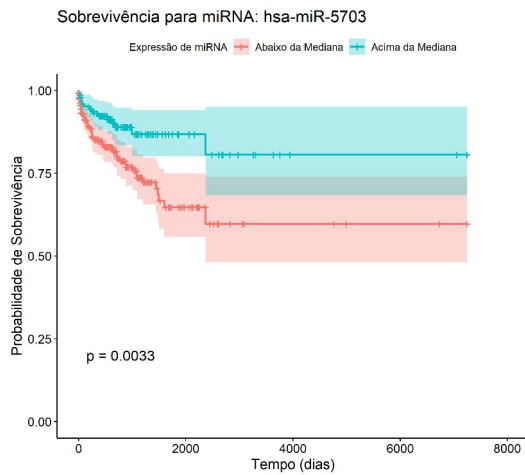


Figura 15 - Análise de sobrevivência do miR-5703

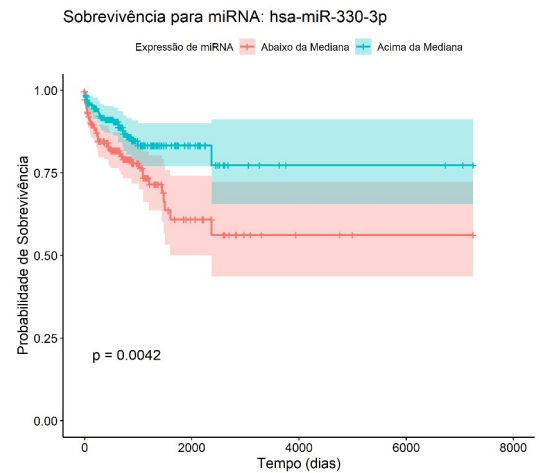


Figura 16 - Análise de sobrevivência do miR-330-3p

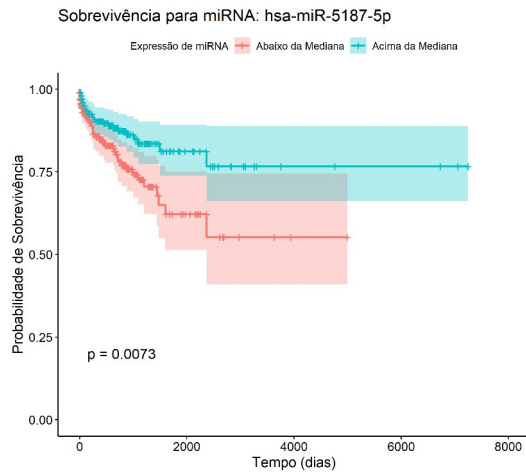


Figura 17 - Análise de sobrevivência do miR-5187-5p

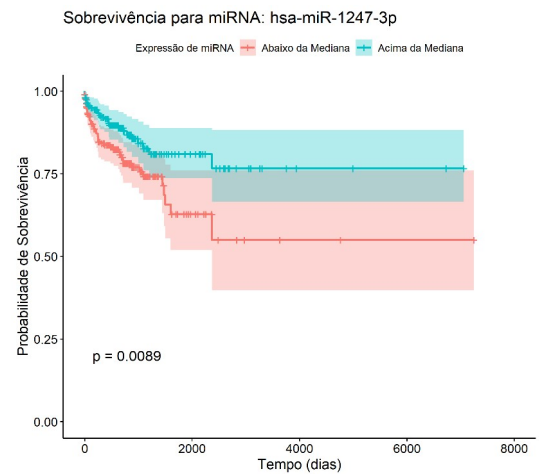


Figura 18 - Análise de sobrevivência do miR-1247-3p

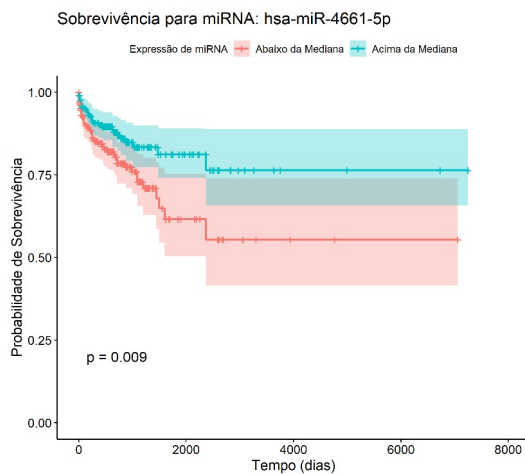


Figura 19 - Análise de sobrevivência do miR-4661-5p

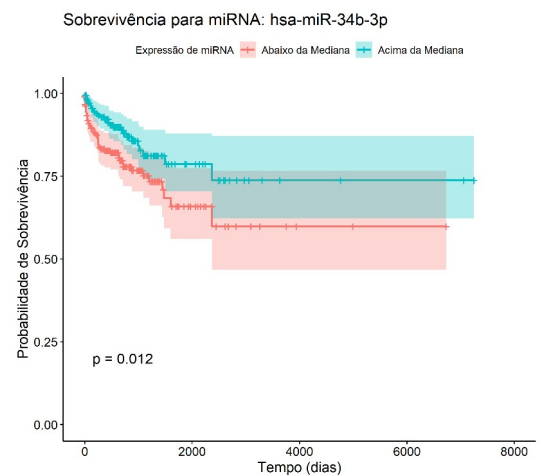


Figura 20 - Análise de sobrevivência do miR-34b-3p

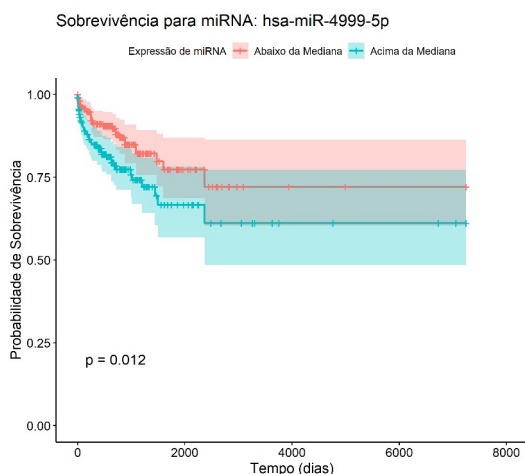


Figura 21 - Análise de sobrevivência do miR-4999-5p

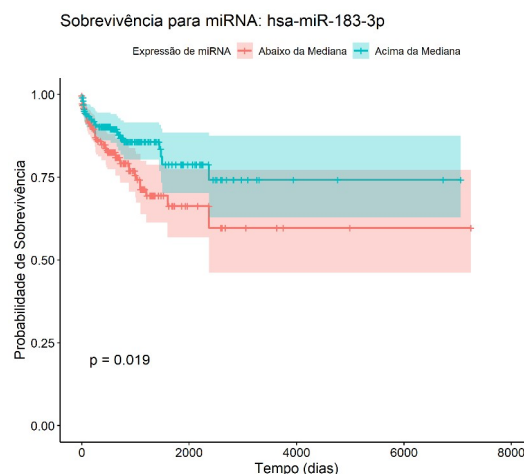


Figura 22 - Análise de sobrevivência do miR-183-3p

### 3.5 Análise das vias dos microRNAs pelo DIANA-miRPath

No total foram feitas três análises utilizando o software DIANA-miRPath, em cada uma delas foram procuradas as vias em que atuam os microRNAs mais significativos nos seguintes testes:

- Teste de Wilcoxon comparando a expressão de microRNA nos tecidos normais e tumorais (Tabela 3).
- Teste de Wilcoxon comparando a expressão de microRNA nos tumores iniciais e avançados (Tabela 4).
- Análises de sobrevivência comparando a expressão dos microRNAs abaixo da mediana e acima da mediana (Tabela 5).

Para melhor compreensão das Figuras 23, 24 e 25: depois de inserir os microRNAs desejados o site DIANA TOOLS faz a relação deles com todas as vias do banco de dados. #KEGG pathway é o nome da via relacionada, KEGG é o bando de dados que eles utilizam (site: <https://www.genome.jp/kegg/>); p-value é o valor de p encontrado relacionando os microRNAs com a via; #genes é o número de genes que atua na via em específico; #miRNAs é o número de microRNAs do conjunto que interage de alguma forma com a via.

As duas vias mais relevantes ao câncer de pulmão encontradas ao buscar pelos microRNAs da Tabela 3 foram as vias de sinalização do TGF-beta e a via de regulação do citoesqueleto de actina.

| # KEGG pathway                                                 | p-value                         | #genes                       | #miRNAs |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------|
| 1. <a href="#">Prion diseases</a> (hsa05020)                   | 2.01606105529e-07               | 10 <a href="#">see genes</a> | 10      |
| 2. <a href="#">Axon guidance</a> (hsa04360)                    | 3.82646976022e-07               | 64 <a href="#">see genes</a> | 17      |
| 3. <a href="#">GABAergic synapse</a> (hsa04727)                | 4.88378429536e-07               | 42 <a href="#">see genes</a> | 16      |
| 4. <a href="#">TGF-beta signaling pathway</a> (hsa04350)       | 8.31519932041e-06               | 38 <a href="#">see genes</a> | 15      |
| 5. <a href="#">Regulation of actin cytoskeleton</a> (hsa04810) | 0.000122281233805 <sup>96</sup> | <a href="#">see genes</a>    | 17      |
| 6. <a href="#">Estrogen signaling pathway</a> (hsa04915)       | 0.000155313032776 <sup>43</sup> | <a href="#">see genes</a>    | 15      |
| 7. <a href="#">Rap1 signaling pathway</a> (hsa04015)           | 0.000271483737474 <sup>92</sup> | <a href="#">see genes</a>    | 16      |
| 8. <a href="#">Endocytosis</a> (hsa04144)                      | 0.00027148373747486             | <a href="#">see genes</a>    | 16      |
| 9. <a href="#">Morphine addiction</a> (hsa05032)               | 0.00027148373747439             | <a href="#">see genes</a>    | 16      |
| 10. <a href="#">FoxO signaling pathway</a> (hsa04068)          | 0.000308006302437 <sup>61</sup> | <a href="#">see genes</a>    | 16      |

Figura 23 - Vias biológicas relacionadas aos microRNAs mais significativos da Tabela 3.

Fonte: DIANA TOOLS.

As evidências atuais indicam que a expressão de TGF- $\beta$  pode prever significativamente um prognóstico pior em pacientes com câncer de pulmão. Todos os resultados revelaram que uma expressão significativamente elevada de TGF- $\beta$  em pacientes foi um indicador de sobrevida ruim (LI et al., 2019).

A metástase do câncer, especificamente a transição epitelial-mesenquimal, que é uma das etapas-chave do processo, é acompanhada pela formação de espessas fibras de estresse por meio das vias de quinase de proteína associada a Rho, MAPK/ERK e WNT. Recentemente, foi demonstrado que células pré-malignas também possuem fibras de estresse e características cito-esqueléticas relacionadas (ARKAPRABHA et al., 2022).

As três vias mais relevantes ao câncer de pulmão encontradas ao buscar pelos microRNAs da Tabela 4 foram as vias de biossíntese de glicanos do tipo O em mucinas, vias de sinalização do TGF-beta e via de sinalização hippo.

| #   | KEGG pathway                                                    | p-value      | #genes                       | #miRNAs |
|-----|-----------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------|---------|
| 1.  | <a href="#">TGF-beta signaling pathway</a> (hsa04350)           | 8.224702e-12 | 35 <a href="#">see genes</a> | 8       |
| 2.  | <a href="#">Gap junction</a> (hsa04540)                         | 1.714991e-10 | 33 <a href="#">see genes</a> | 12      |
| 3.  | <a href="#">mRNA surveillance pathway</a> (hsa03015)            | 3.888771e-10 | 35 <a href="#">see genes</a> | 9       |
| 4.  | <a href="#">Neurotrophin signaling pathway</a> (hsa04722)       | 1.211949e-08 | 44 <a href="#">see genes</a> | 14      |
| 5.  | <a href="#">Focal adhesion</a> (hsa04510)                       | 1.732527e-08 | 64 <a href="#">see genes</a> | 13      |
| 6.  | <a href="#">Axon guidance</a> (hsa04360)                        | 2.100207e-08 | 48 <a href="#">see genes</a> | 10      |
| 7.  | <a href="#">PI3K-Akt signaling pathway</a> (hsa04151)           | 2.100207e-08 | 99 <a href="#">see genes</a> | 13      |
| 8.  | <a href="#">Retrograde endocannabinoid signaling</a> (hsa04723) | 5.116413e-08 | 41 <a href="#">see genes</a> | 12      |
| 9.  | <a href="#">Glutamatergic synapse</a> (hsa04724)                | 5.143259e-08 | 42 <a href="#">see genes</a> | 10      |
| 10. | <a href="#">Prion diseases</a> (hsa05020)                       | 5.276625e-08 | 9 <a href="#">see genes</a>  | 5       |

Figura 24 - Vias biológicas relacionadas aos microRNAs mais significativos da Tabela 4.

Fonte: DIANA TOOLS.

Os perfis de glicanos em amostras de câncer de pulmão de células não pequenas foram significativamente diferentes quando comparadas ao grupo de controle saudável, e a maioria das mudanças na glicosilação ocorreu em estágios iniciais (LIANG et al, 2019).

Estudos recentes têm mostrado a participação do caminho Hippo na carcinogênese pulmonar. Este caminho pode afetar o câncer de pulmão por meio de diferentes mecanismos. A interação entre alguns microRNAs e o caminho Hippo é um possível mecanismo para processos carcinogênicos. Além disso, os efeitos anticancerígenos de vários compostos orgânicos no câncer de pulmão são mediados pela modulação do caminho Hippo (GHAFOURI-FARD et al, 2023).

As duas vias mais relevantes ao câncer de pulmão encontradas ao buscar pelos microRNAs da Tabela 5 foram as vias de proteoglicanos no câncer e vias de sinalização ERBB.

| #   | KEGG pathway                                              | p-value      | #genes                       | #miRNAs |
|-----|-----------------------------------------------------------|--------------|------------------------------|---------|
| 1.  | <a href="#">Neurotrophin signaling pathway (hsa04722)</a> | 4.427286e-15 | 41 <a href="#">see genes</a> | 14      |
| 2.  | <a href="#">Chronic myeloid leukemia (hsa05220)</a>       | 3.386061e-11 | 27 <a href="#">see genes</a> | 10      |
| 3.  | <a href="#">ErbB signaling pathway (hsa04012)</a>         | 3.386061e-11 | 31 <a href="#">see genes</a> | 12      |
| 4.  | <a href="#">Long-term potentiation (hsa04720)</a>         | 5.668722e-11 | 25 <a href="#">see genes</a> | 11      |
| 5.  | <a href="#">Gap junction (hsa04540)</a>                   | 3.504025e-10 | 30 <a href="#">see genes</a> | 13      |
| 6.  | <a href="#">Endometrial cancer (hsa05213)</a>             | 7.067701e-09 | 19 <a href="#">see genes</a> | 11      |
| 7.  | <a href="#">Acute myeloid leukemia (hsa05221)</a>         | 1.208293e-06 | 19 <a href="#">see genes</a> | 11      |
| 8.  | <a href="#">Insulin signaling pathway (hsa04910)</a>      | 1.208293e-06 | 36 <a href="#">see genes</a> | 14      |
| 9.  | <a href="#">GnRH signaling pathway (hsa04912)</a>         | 1.406783e-06 | 26 <a href="#">see genes</a> | 12      |
| 10. | <a href="#">Renal cell carcinoma (hsa05211)</a>           | 3.307474e-06 | 23 <a href="#">see genes</a> | 10      |

Figura 25 - Vias biológicas relacionadas aos microRNAs mais significativos da Tabela 5.

FONTE: DIANATOOLS

A alta expressão de biglicanos nas células endoteliais tumorais é significativamente associada ao fator tumoral e é um preditor negativo significativo. Os níveis de biglicanos no soro dos pacientes com câncer de pulmão estavam significativamente correlacionados com a expressão de biglicanos nas células endoteliais tumorais. O nível sérico pré-operatório de biglicanos foi significativamente mais baixo em voluntários saudáveis e em adenocarcinomas menos invasivos do que em adenocarcinomas invasivos e outros carcinomas pulmonares. Esses resultados sugerem que o baixo nível de biglicanos no soro pré-operatório em pacientes com câncer de pulmão pode indicar baixa malignidade (MORIMOTO et al, 2021).

A desregulação da via de sinalização ERBB/EGFR causa vários tipos de câncer. Consequentemente, a ADAM17, principal enzima de liberação que libera e ativa os ligantes ERBB, é rigorosamente regulada. Os mutantes oncogênicos do KRAS direcionam o domínio citoplasmático da iRhom2 para induzir a liberação dependente da ADAM17 e a ativação dos ligantes ERBB. Nesse contexto, a atividade do KRAS oncogênico é modulada pela liberação dependente da iRhom2 dos ligantes ERBB, colocando o domínio citoplasmático da iRhom2 como um componente central de um ciclo de retroalimentação positiva em células de câncer de pulmão (SIEBER et al, 2022).

Dos 19 microRNAs significativos da Tabela 3 nas vias relacionadas ao câncer de pulmão temos que:

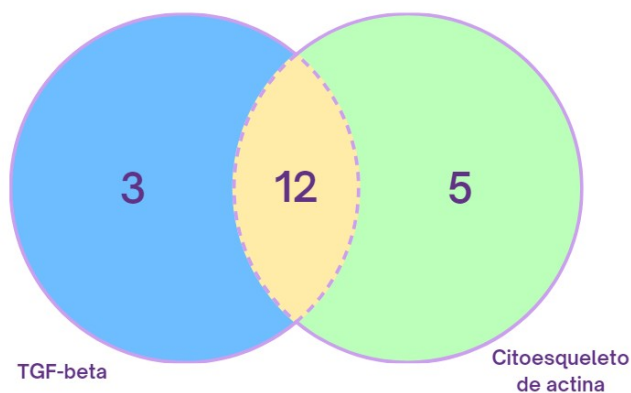


Figura 26 - Diagrama de Venn TGF / Citoesqueleto.  
Fonte: Autor.

Os 12 microRNAs que participam em ambas as vias da Figura 26 são: miR-3607-3p; miR-301a-5p; miR-183-5p; miR-141-3p; miR-577; miR-4668-3p; miR-301b-3p; miR-182-5p; miR-616-5p; miR-21-3p; miR-629-3p; miR-33b-5p.

Dos 23 microRNAs significativos da Tabela 4 nas vias relacionadas ao câncer de pulmão temos que:

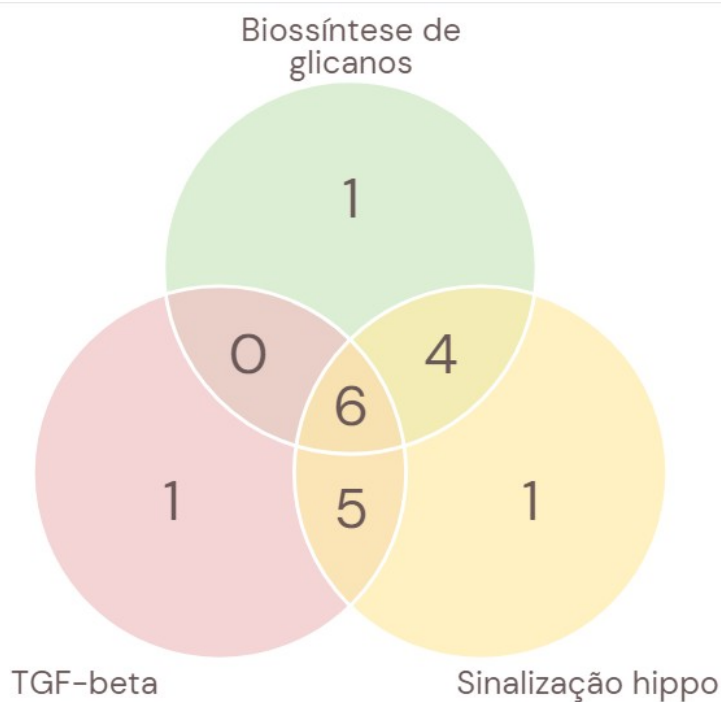


Figura 27 - Diagrama de Venn Glicanos / TGF / hippo. Fonte: Autor



Os 6 microRNAs que possuem relação com todas as vias da Figura 27 são: miR-216a-5p; miR-590-3p; miR-6802-3p; miR-5699-3p; miR-10b-5p; miR-195-3p.

Dos 22 microRNAs significativos da Tabela 5 nas vias relacionadas ao câncer de pulmão temos que:

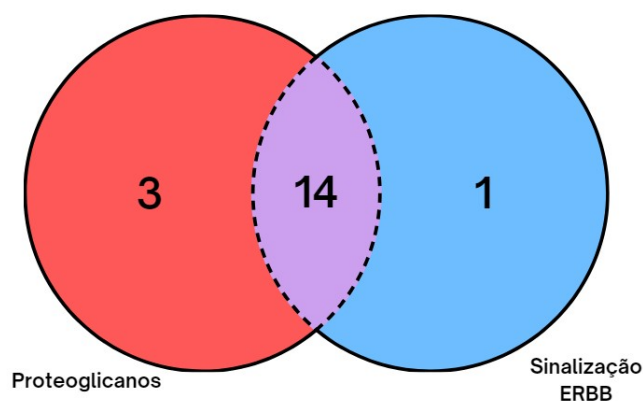


Figura 28 - Diagrama de Venn Proteoglicanos / ERBB. Fonte: Autor.

Os 14 microRNAs que possuem relação com todas as vias da Figura 28 são: miR-200b-5p; miR-210-5p; miR-4999-5p; miR-34b-3p; miR-6761-5p; miR-330-3p; miR-185-3p; miR-589-5p; miR-183-3p; miR-3942-5p; miR-451a; miR-5703; miR-490-3p; miR-5187-5p.

#### 4. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos é crucial para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico precoce e tratamento eficaz. Neste estudo, foi explorada a relação entre o câncer de pulmão e os microRNAs.

O Teste de Wilcoxon Mann-Whitney foi o primeiro método para filtrar e separar os microRNAs de acordo com os resultados obtidos ao comparar sua expressão em tecidos normais e tumorais, e em tumores iniciais e avançados. Adicionalmente foram feitas correções estatísticas e gráficos boxplot para averiguar os resultados e garantir uma maior veracidade. As análises de sobrevivência foram feitas para procurar microRNAs que influenciem na sobrevida dos pacientes e que tenham alguma relação com as anteriormente obtidas nos testes de Wilcoxon Mann-Whitney.

Os resultados dos testes de Wilcoxon e das análises de sobrevivência forneceram uma lista de microRNAs potencialmente relevantes. Esses microRNAs podem ser candidatos promissores para biomarcadores de câncer de pulmão.

As análises biológicas realizadas com o DIANA-miRPath tiveram como objetivo investigar se as vias moleculares reguladas pelos microRNAs identificados estavam associadas ao desenvolvimento do câncer. Os resultados indicam uma conexão significativa, sugerindo que os microRNAs examinados neste estudo apresentam ligações relevantes e podem ser considerados potenciais biomarcadores para o adenocarcinoma pulmonar. Essa observação fortalece a importância desses microRNAs como alvos promissores para estudos futuros e destaca seu potencial aplicativo no contexto do diagnóstico e prognóstico dessa forma específica de câncer de pulmão.

A identificação de vias como sinalização do TGF-beta, regulação do citoesqueleto de actina, biossíntese de glicanos, sinalização de proteoglicanos, via de sinalização hippo e sinalização ERBB fornecem uma ligação valiosa sobre os mecanismos subjacentes à carcinogênese pulmonar e destacam alvos terapêuticos (LI et al., 2019; ARKAPRABHA et al., 2022; LIANG et al., 2019; GHAFOURI-FARD et al., 2023; MORIMOTO et al., 2021; SIEBER et al., 2022).

Os microRNAs que possuem uma expressão alterada em tecidos normais e tumorais, atuam em vias de sinalização do TGF-beta e vias de regulação do citoesqueleto de actina e podem servir como biomarcadores nestes casos são: miR-3607-3p; miR-301a-5p; miR-183-5p; miR-141-3p; miR-577; miR-4668-3p; miR-301b-3p; miR-182-5p; miR-616-5p; miR-21-3p; miR-629-3p; miR-33b-5p. Na literatura encontram-se o miR-183-5p, miR-182-5p, miR-577, miR-141-3p, e miR-21-3p como os mais relevantes e citados desse conjunto (CHO et al., 2009; LI et al., 2019; REN et al., 2018).

Os microRNAs que possuem uma expressão alterada no tumor inicial e avançado, atuam em vias de biossíntese de glicanos do tipo O em mucinas, vias de sinalização do TGF-beta e vias de sinalização hippo e podem servir de biomarcadores nestes casos são: miR-216a-5p; miR-590-3p; miR-6802-3p; miR-5699-3p; miR-10b-5p; miR-195-3p. Na literatura encontram-se o miR-216a-5p e miR-10b-5p como os mais relevantes e citados desse conjunto (YE et al., 2022; SUN et al., 2018).

Os microRNAs que possuem uma diferença significativa na análise de sobrevivência, atuam em vias de proteoglicanos no câncer e vias de sinalização ERBB e podem servir de biomarcadores nestes casos são: miR-200b-5p; miR-210-5p; miR-4999-5p; miR-34b-3p; miR-6761-5p; miR-330-3p; miR-185-3p; miR-589-5p; miR-183-3p; miR-3942-5p; miR-451a; miR-

5703; miR-490-3p; miR-5187-5p. Na literatura encontram-se o miR-200b-5p, miR-210-5p, miR-34b-3p, miR-330-3p e miR-183-3p como os mais relevantes e citados desse conjunto (LI et al., 2019; MIZUNO et al., 2017; SHEN et al., 2018; REN et al., 2018; CHOW et al., 2009).

Por final, este estudo contribui para a compreensão da complexidade molecular do câncer de pulmão, identificando microRNAs relevantes e suas vias associadas. Os resultados fornecem uma base sólida para futuras pesquisas e abrem caminho para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no diagnóstico e tratamento personalizado do câncer de pulmão.

## 5. CONCLUSÃO

Com esse estudo é possível concluir que existe uma relação entre a alteração na expressão dos microRNAs e o adenocarcinoma pulmonar, tornando-os assim viáveis como biomarcadores de câncer de pulmão e seu estagiamento.

Os microRNAs que se encontram com a expressão alterada nos testes estatísticos, participam de processos biológicos relacionados ao câncer e são citados tendo relação com o adenocarcinoma na literatura, podendo assim serem classificados como biomarcadores, são:

- Considerando a comparação entre tecido normal e tecido tumoral:  
miR-183-5p, miR-182-5p, miR-577, miR-141-3p, e miR-21-3p
- Considerando a comparação entre tumor inicial e tumor avançado:  
miR-216a-5p e miR-10b-5p
- Considerando a diferença das curvas da análise sobrevivência:  
miR-200b-5p, miR-210-5p, miR-34b-3p, miR-330-3p e miR-183-3p

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, B. R.** Análise estatística baseada na construção de árvores de classificação e regressão de microRNAs de pacientes com adenocarcinoma pulmonar. Repositório Institucional UNESP, Botucatu, 2020. <http://hdl.handle.net/11449/192594>
- JORGE, A. L.; PEREIRA, E. R.; OLIVEIRA, C. S. et al.** MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. *einstein*. São Paulo. 2021. 19:eRB5996.
- YANG, K.; FUNG, T.T.; NAN, H.** An Epidemiological Review of Diet and Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018 Oct;27(10):1115-1122. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0243. Epub, 2018 Jul 17. PMID: 30018150.

**GUO, C.; YO, S.; JANG, W.** Evaluating predictive accuracy of survival models with PROC PHREG. In: SAS, 2018. Corpus ID: 38691720.

**VLACHOS; IOANNIS S., ZAGGANAS, K. et al.** DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*, 2015: gkv403.

**BIANCHI, F.; DAMA, E.; MELOCCHI, V.** PROGNOSTIC METHOD FOR AGGRESSIVE LUNG ADENOCARCINOMAS. EUROPEAN PATENT. 2022.

**SHEN, Y. et al.** MicroRNA profile changes in liraglutide treated steatotic HepG2 cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine (IJCEM)*, v. 10, n. 3, p. 4856-4864, 2017.

**LIANG, Y.; HAN, P.; WANG, T. et al.** Stage-associated differences in the serum N- and O-glycan profiles of patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Proteomics*, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9240-6>.

**LI, J.; SHEN, C.; WANG, X.; LAI, Y.; ZHOU, K.; LI, P.; LIU, L.; CHE, G.** Prognostic value of TGF- $\beta$  in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5917-5>.

**ARKAPRABHA, B.; MANASH, K. P.; Weiss, S.** The actin cytoskeleton: Morphological changes in pre and fully developed lung cancer. AIP Publishing, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0096188>.

**GHAFOURI-FARD, S.; POORNAJAF, Y.; HUSSEN, B. M.; TAVAKKOLI AVVAL, S.; TAHERI, M.; MOKHTARI, M.** Deciphering the role of Hippo pathway in lung cancer. *Science Direct*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154339>.

**MORIMOTO, H.; HIDA, Y.; MAISHI, N.; NISHIHARA, H.; HATANAKA, Y.; LI, C.; MATSUNO, Y.; NAKAMURA, T.; HIRANO, S.; HIDA, K.** (2021). Biglycan, tumor endothelial cell-secreting proteoglycan, as possible biomarker for lung cancer. Wiley, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13907>.

**SIEBER, Boris; LU, Fangfang; STRIBBLING, Stephen M.; GRIEVE, Adam G.; RYAN, Anderson J.; FREEMAN, Matthew.** iRhom2 regulates ERBB signalling to promote KRAS-driven tumour growth of lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, [S.l.], v. 135, n. 17, p. jcs262428, 08 set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.259949>.

**LI, W., JIA, M. X., DENG, J., WANG, J. H., LIN, Q. L., TANG, J. X., ZENG, X. X., CAI, F., MA, L., SU, W., LIU, X. Y., LIU, C., WANG, S. S., & ZHOU, L. Y.** Down-regulation of microRNA-200b is a potential prognostic marker of lung cancer in southern-central Chinese population. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019.

**MIZUNO, K., MATAKI, H., ARAI, T., OKATO, A., KAMIKAWAJI, K., KUMAMOTO, T., HIRAKI, T., HATANAKA, K., INOUE, H., & SEKI, N.** The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *Journal of Human Genetics*, 2017. doi:10.1038/jhg.2016.161

**SHEN, L., YI, S., HUANG, L., LI, S., BAI, F., LEI, S., BREITZIG, M., CZACHOR, A., SUN, H., ZHENG, Q., & WANG, F.** miR-330-3p promotes lung cancer cells invasion, migration, and metastasis by directly targeting hSOD2b. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018 <https://doi.org/10.1002/bab.1691>

**REN, Z.-P., HOU, X.-B., TIAN, X.-D., GUO, J.-T., ZHANG, L.-B., XUE, Z.-Q., DENG, J.-Q., ZHANG, S.-W., PAN, J.-Y., & CHU, X.-Y.** Identification of nine microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. *FEBS Open Bio*, 2018. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12572>.

**LI, W., CUI, Y., WANG, D., WANG, Y., & WANG, L.** MiR-141-3p functions as a tumor suppressor through directly targeting ZFR in non-small cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.089>

**CHO, W. C. S., CHOW, A. S. C., & AU, J. S. K.** Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *European Journal of Cancer*, 2009. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.039

University of Thessaly. DIANA-miRPath: Analysis of miRNA Pathways. Disponível em: <<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php>>. Acesso em: 24/11/2023.

The Lungs. National Heart, Lung, and Blood Institute. (2022). How the Lungs Work. Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/how-lungs-work>>. Acesso em 24/11/2023.

American Cancer Society. (2023). What Is Lung Cancer?. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>>. Acesso em 24/11/2023.

Instituto Nacional do Câncer. (2022). Câncer de pulmão. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>>. Acesso em 24/11/2023.

Instituto Nacional de Câncer. (2020). Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 24/11/2023

LUNGeVity. (2021). How Lung Cancer Develops. LUNGeVity Foundation. Disponível em: <<https://lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/how-lung-cancer-develops>>. Acesso em 24/11/2023.

Cancer Research UK. (2023). Treatment options for non small cell lung cancer (NSCLC). Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/treatment/non-small-cell-lung-cancer>>. Acesso em 24/11/2023.

American Cancer Society. (2023). Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer, by Stage. Disponível em:<<https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/treating-non-small-cell/by-stage.html>>. Acesso em 24/11/2023.

Division of Cancer Prevention and Control. (2023). What Are the Risk Factors for Lung Cancer?. CDC. Disponível em:<[https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic\\_info/risk\\_factors.htm](https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm)>. Acesso em 24/11/2023.

Medicina de precisão do Hospital Israelita Albert Einstein. (2021). Linguagem R: importante ferramenta de bioinformática. varsomics. Disponível em: <<https://blog.varsomics.com/linguagem-r-na-pesquisa-cientifica/>>. Acesso em 24/11/2023.

Fundação Oncocentro de São Paulo. (2021). Classificação de Tumores Malignos. FOSP. Disponível em: <<https://fosp.saude.sp.gov.br/>>. Acesso em 24/11/2023.

Oncocenter. (2020). Câncer de pulmão: quais os principais tipos?. Clínica Oncocenter. Disponível em: <<https://oncocentermedicos.com.br/cancer-de-pulmao-quais-os-principais-tipos/>>. Acesso em 24/11/2023.