Workshop de Informática Biomédica (WIBm)
ISSN 2237-3594

www.informaticabiomedica.com.br/wibm

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E DE MICRORNAS EM LARGA ESCALA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LARINGE

Matheus Carvalho Bürger[1,2], Daniel Guariz Pinheiro[1,2], Rafaela de Barros e Lima Bueno[1,2], Amélia Góes de Araújo[2], David Livingstone Alves Figueiredo[3], Rui Celso Martins Mamede[3], Wilson Araújo da Silva[1,2]

[1] Departamento de Genética – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil
[2] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular – Centro Regional de Hemoterapia, Ribeirão Preto, Brasil
[3] Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

Resumo: O carcinoma de cabeça e pescoço apresenta grande heterogeneidade, assim, mesmo com os avanços científicos alcançados, não houve melhora significativa no prognóstico dos pacientes. Este trabalho visa estudar o perfil de expressão de genes e microRNAs em pacientes com carcinoma espinocelular de laringe afim de elucidar as bases moleculares desta doença.

Palavras-chave: MicroRNAs, Expressão Gênica, Neoplasias de Cabeça e Pescoço.

***Abstract**: Head and neck carcinoma (HN) shows a large heterogeneity, thus, even with the scientific advances reached, there is a poor improvement in the patient prognostic. This work aim to study the gene and microRNA expression profile in patients diagnosed with laryngeal squamous cell carcinoma in order to elucidate the molecular basis of this disease.*

***Keywords**: MicroRNAs, Gene Expression Profiling, Head and Neck Neoplasms.*

Introdução

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é caracterizado pelo conjunto de tumores presentes na região da cavidade oral, orofaringe e laringe[1]. Mais especificamente, o carcinoma espinocelular de laringe predomina em mais de 95% dos casos de CCP[2]. Assim, o câncer de laringe é responsável por mais de 2% dos casos de câncer no mundo anualmente [3].

Informações sobre o perfil de expressão gênica entre tecidos normais e tumorais podem esclarecer quais mecanismos genéticos estão envolvidos com a tumorigênese. O estudo da expressão gênica pode levar ao entendimento do funcionamento subjacente da doença sugerindo, por exemplo, novas abordagens no tratamento. O presente estudo visa avaliar os perfis de expressão de genes e microRNAs (miRNAs) em amostras provenientes de pacientes com carcinoma espinocelular de laringe no estágio inicial e avançado.

Métodos

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras extraídas do tecido tumoral de pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço em dois estágios, inicial e avançado. A margem do tumor foi utilizada como controle. A análise de expressão foi realizada com ensaios de microarranjos da plataforma Agilent. Em seguida, os dados brutos foram

Workshop de Informática Biomédica (WIBm)
ISSN 2237-3594

www.informaticabiomedica.com.br/wibm

processados para avaliar a qualidade dos experimentos de microarranjos, verificando-se a necessidade de exclusão de algumas amostras[4]. A normalização dos dados foi realizada de forma progressiva, entre réplicas biológicas e todas as amostras, utilizando os métodos *loess* e *quantile*, respectivamente[5]. A análise para avaliar a identidade entre as amostras foi realizada utilizando a abordagem de *consensus clustering*[6]. O teste de hipóteses foi realizado para avaliar se houve diferença significativa entre a média de expressão das classes Tumor e Margem, extraindo somente genes com *fold-change* absoluto maior que 10 e *p-valor* menor que 10e-7 e miRNAs com *fold-change* absoluto maior que 1.5 e *p-valor* menor que 0.05. Para os genes selecionados, a análise de enriquecimento funcional foi realizada através do teste de hiper-representação sobre as ontologias, vias gênicas e módulos disponibilizados pelo *the Gene Ontology*[7], *KEGG*[8] e *MSigDB/GSEA*[9], respectivamente.

Resultados

Um total de 10 genes foram selecionados para a validação experimental através do *PCR* quantitativo em tempo real. Todos os resultados corroboram com os dados obtidos a partir dos experimentos de microarranjos.

Os genes e miRNAs diferencialmente expressos foram combinados utilizando os bancos de dados de interação entre miRNA e seus mRNA alvos, como *miranda*[10], *mirbase*[11], *mirtarget2*, *pictar*[12] e *targetscan*[13-15]. Para a realizar a predição in silico da interação miRNA:mRNA tais bancos analisam a complementaridade das sequencias de nucleotídeos, as famílias de miRNAs, sítios conservados na região 3' UTR. Outro banco de dados, o *tarbase*[16], o qual possui somente relações validadas experimentalmente, também foi utilizado no conjuunto da análise. Através das relações extraídas desses bancos de dados[17] foi possível encontrar 11.951 relações concordantes entre genes e miRNAs, ou seja, com expressão correlacionadas negativamente.

Conclusão

Através deste estudo foi possível avaliar genes potencialmente importantes para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de laringe, bem como suas vias gênicas envolvidas. Foram avaliados também miRNAs que podem afetar significativamente a expressão de alguns genes, porém mais estudos são necessários para a validação dos resultados.

Referências

[1] Condutas do INCA/MS. Carcinoma Epidermóide da Cabeça e Pescoço. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_47/v04/pdf/normas.pdf. Data de acesso: 18/09/2012

[2] Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. Cancer. v. 75. n. 1. 1995. p.147-153. PMID: 8000993 Disponível em : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8000993

[3] Globocan 2008. Fast Stats. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#BOTH. Data de acesso: 18/09/2012

[4] Kauffmann A, Gentleman R, Huber W. arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. Bioinformatics. v. 25. n. 3. 2009. p.415-416. Epub

Workshop de Informática Biomédica (WIBm)
ISSN 2237-3594

www.informaticabiomedica.com.br/wibm

2008 Dec 23. PMID: 19106121 Disponível em : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106121

[5] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics. v. 19. n. 2. 2003. p.185-193. PMID: 12538238. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538238

[6] Wilkerson MD, Hayes DN. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking. Bioinformatics. v. 26. n. 12. 2010. p.1572-1573. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427518 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427518

[7] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. v. 25. n. 1. 2000. p.25-29. PMID: 10802651 Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802651

[8] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. v. 28. n. 1. 2000. p.27-30.

[9] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 102. n. 43. 2005. p.15545-14450. Epub 2005 Sep 30. PMID: 16199517 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199517

[10] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. PLoS Biol. v. 2. n. 11. 2004. p.e363. Epub 2004 Oct 5. PMID: 15502875 Disponível em : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502875

[11] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. v. 1. n. 34. (Database issue):D140-144. 2006. PMID: 16381832 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381832

[12] Lall S, Grün D, Krek A, Chen K, Wang YL, Dewey CN, Sood P, Colombo T, Bray N, Macmenamin P, Kao HL, Gunsalus KC, Pachter L, Piano F, Rajewsky N. A genome-wide map of conserved microRNA targets in C. elegans. Curr Biol. v. 16. n. 5. 2006. p.460-471. Epub 2006 Feb 2. PMID: 16458514 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16458514

[13] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. v. 120. n. 1. 2005. p.15-20. PMID: 15652477. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477

[14] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. v. 19. n. 1. 2009. p.92-105. Epub 2008 Oct 27. PMID: 18955434 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955434

[15] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell. v. 27. n. 1. 2007. p.91-105. PMID: 17612493 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612493

Workshop de Informática Biomédica (WIBm)
ISSN 2237-3594

www.informaticabiomedica.com.br/wibm

[16] Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. Nucleic Acids Res. v. 37(Database issue):D155-8. 2009. Epub 2008 Oct 27. PMID: 18957447 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957447

[17] Favero F. RmiR.Hs.miRNA: Various databases of microRNA Targets. R package version 1.0.6

Contato

Matheus Carvalho Bürger; E-mail: matheus.cburger@gmail.com
Endereço: Rua Tenente Catão Roxo, 2501; Telefone: +55 16 2101 9362