



Análisis *in silico* de miRNAs en cáncer cérvico-uterino

Alvarado Camacho Diego Armando *¹, Yamile López Hernández ¹, López Jesús Adrián ¹

Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus II UAZ, Av.
Preparatoria s/n. Colonia Agronómica. Zacatecas, Zac. México. CP. 98066.

E-mail: diego_arm1320@hotmail.com

Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son de RNAs pequeños no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud con funciones reguladoras post-transcripcionales. La desregulación de miRNAs ha sido implicada en una amplia gama de enfermedades complejas como múltiples tipos de cáncer mediante la regulación de diversos procesos celulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in silico* los genes blancos y procesos celulares regulados por miRNAs diferencialmente expresados a partir del análisis de microarreglos con muestras sin alteración y con cáncer cérvico-uterino (CaCu). Se utilizaron dos programas red gratuitos “mirnet”, el cual tiene una colección completa de anotaciones funcionales basadas en la integración de 11 bases de datos de miRNAs y sus interacciones a diferentes niveles y enfermedades. También se utilizó la herramienta GEO2R para llevar a cabo el análisis de expresión diferencial a partir del microarreglo con número de identificación GSE112743. Se obtuvieron 12 miRNAs con expresión reducida (hsa-miR-4653-3p, hsa-miR-4497, hsa-miR-4430, hsa-miR-4695-5p, hsa-miR-1973, hsa-miR-4485, hsa-miR-494, hsa-miR-1233-1-5p, hsa-miR-4656, hsa-miR-3648, hsa-miR-663a, hsa-miR-181b-5p) que regulan 3437 genes y 19 sobre expresados (hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-1285-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-210, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-1260b, hsa-miR-203a, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-451a) que regulan 3913 genes. Después se evaluaron las vías y procesos celulares regulados por miRNAs. Las herramientas bioinformáticas han experimentado un gran avance en los últimos años en diferentes disciplinas. Se ha trabajado en el objetivo de integrar diferentes recursos encontrados en las bases de datos para comprender mejor sus mecanismos reguladores. En la presente evaluación, se encontraron en total 7,350 genes relacionados con las vías relacionadas a cáncer y p53, ciclo celular, regulación de citoesqueleto, apoptosis adhesión focal, procesamiento de proteínas, entre otras, lo que sugiere que los miRNAs participan en la biogénesis de cáncer cérvico-uterino.



Abstract

The microRNAs (miRNAs) are small non coding RNAs from approximately 22 nucleotides length that regulated functions at post-transcriptional levels. The deregulation of miRNAs has involved a wide spectrum of complex diseases such as multiple types of cancer since they regulate a diversity of cellular processes. The objective of this work was to evaluate *in silico* the target genes and cellular processes regulated by miRNAs differentially expressed from microarray analysis with normal samples and with cervical cancer (CaCu). Two free web programs “mirnet” were used, one of those has a complete collection of functional notes based on the integration of 11 data bases about miRNAs and its interactions to different levels and diseases. The GEO2R was also used to perform the analysis from the microarray with differential expression with identification number GSE112743. 12 miRNAs were obtained with reduced expression (hsa-miR-4653-3p, hsa-miR-4497, hsa-miR-4430, hsa-miR-4695-5p, hsa-miR-1973, hsa-miR-4485, hsa-miR-494, hsa-miR-1233-1-5p, hsa-miR-4656, hsa-miR-3648, hsa-miR-663a, hsa-miR-181b-5p) that regulate 3437 genes and 19 over expressed (hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-1285-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-210, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-1260b, hsa-miR-203a, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-451a) that regulate 3913 genes. The cellular pathways and processes involved in the gene regulation by these miRNAs were evaluated. Bioinformatics tools have experienced great progress in recent years in different disciplines. It has been work with the objective of integrating different resources found in the databases to better understand their regulatory mechanisms. In the present evaluation, a total of 7,350 genes related to pathways related to cancer and p53, cell cycle, cytoskeleton regulation, focal adhesion, apoptosis, protein processing, among others, were found, suggesting that miRNAs participate in the biogenesis of CaCu.



Introducción

De acuerdo a estadísticas globales relacionadas a cáncer, se sabe que el CaCu ocupa el cuarto lugar como la neoplasia maligna más común y la segunda en áreas desarrolladas [1]. Aunque los tratamientos actuales mejoran la sobrevivencia de los pacientes, se tiene registro que aproximadamente el 40% de los pacientes experimenta recurrencia [1, 2]. Razón por la cual es necesario contar con marcadores tumorales que puedan ayudar con la prevención, diagnóstico y tratamiento del CaCu [3, 4]. El descubrimiento de biomarcadores utilizando GEO y otras plataformas de datos ha sido de gran utilidad para revelar una serie de moléculas que pueden ser altamente sensitivas y específicas [1]. Por lo tanto, con la ayuda de tecnologías asistidas por computadora, se han logrado establecer técnicas de simulación, que nos han guiado en el entendimiento de nuevos mecanismos moleculares implicados en la enfermedad [5, 6].

Los microRNAs son una clase de RNAs pequeños de aproximadamente 23 nt, no codificantes, cuya función radica en la regulación génica, moderando procesos biológicos importantes como: proliferación, diferenciación, apoptosis, migración, entre otros [7, 8]. El análisis informático de estos RNAs pequeños ha demostrado que mutaciones en su sitio de unión, así como diferencias en sus

patrones de expresión puede resultar en varios tipos de neoplasias [9].

Los microarreglos basados en plataformas de alto rendimiento emergen como una herramienta prometedora y eficiente para identificar biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer [10]. Recientemente, algunos investigadores han utilizado datos relacionados con GEO o TCGA para identificar miRNAs relevantes en pacientes con cáncer de mama resistentes a la quimioterapia como miR-196a-5p, miR-16-5p y miR489 y otros estudios identificaron y validaron siete miRNAs para el carcinoma hepatocelular, que pueden usarse para evaluar la supervivencia de los pacientes [1, 11].

Resultados.

En este trabajo se evaluaron *in silico* los genes blancos y procesos celulares regulados por miRNAs diferencialmente expresados a partir del análisis del microarreglo GSE112743 el cual consta de 2 muestras normales, 3 con carcinoma de células escamosas y 3 con carcinoma de células escamosas metastásicas. Para el proceso de análisis diferencial del microarreglo se utilizó la herramienta online GEO2R, en la que se obtienen 261 miRNAs. Sin embargo, mediante la aplicación de un criterio de corte aplicado de un valor de $P < 0.05$ y un $\text{LogFc} < 1.5$ y > 1.5 , se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 1 y 2).



ID	P.Value	logFC
hsa-miR-4653	0.00413	-3.93859
hsa-miR-4497	0.0036	-2.60466
hsa-miR-4430	0.00508	-2.57332
hsa-miR-4695	0.00218	-2.49262
hsa-miR-1973	0.00279	-2.45766
hsa-miR-4485	0.00311	-2.27633
hsa-miR-494	0.04474	-2.24436
hsa-miR-1233	0.01134	-1.8909
hsa-miR-4656	0.02736	-1.77271
hsa-miR-3648	0.02741	-1.73711
hsa-miR-663a	0.03056	-1.7269
hsa-miR-181b	0.02644	-1.64032

Tabla 1. miRNAs con expresión reducida

ID	P.Value	logFC
hsa-miR-30e-	0.01948	1.54058
hsa-miR-141-	0.04241	1.54177
hsa-miR-1285	0.03818	1.5719
hsa-miR-185-	0.0485	1.75263
hsa-miR-15a-	0.02573	2.01316
hsa-miR-429	0.01065	2.09638
hsa-miR-29a-	0.0198	2.13401
hsa-miR-29c-	0.02259	2.31596
hsa-miR-193b	0.02572	2.35234
hsa-miR-26b-	0.03339	2.42266
hsa-miR-29b-	0.01188	2.43066
hsa-miR-210	0.00589	2.54635
hsa-miR-148a	0.00986	2.5868
hsa-miR-1260	0.02393	2.66927
hsa-miR-142-	0.00332	2.92922
hsa-miR-1260	0.00173	3.92691
hsa-miR-203a	0.01271	4.08631
hsa-miR-223-	0.00931	4.36736
hsa-miR-451a	0.00679	5.07021

Tabla 2. miRNAs con expresión aumentada

También para poder corroborar como es que están distribuidos los datos dentro del microarreglo se generó un mapa de calor con los valores de expresión generados en GEO2R (Fig.1).

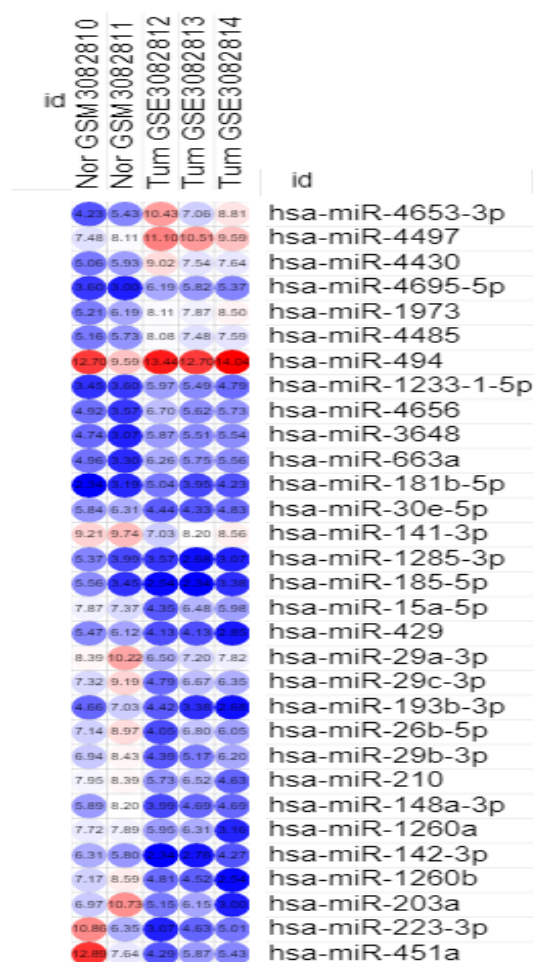


Figura 1. Mapa de calor de miRNA expresados diferencialmente del conjunto de datos GSE112743. Rojo, regulación ascendente; azul, regulación reducida.

Después mediante el uso una herramienta bioinformática disponible gratuitamente online “miRNet” se construyeron redes para poder llevar a cabo la visualización de las interacciones entre miRNAs y genes blancos (Fig. 2 y 3), así como también procesos biológicos implicados en vías de señalización (Tabla 3 y 4).

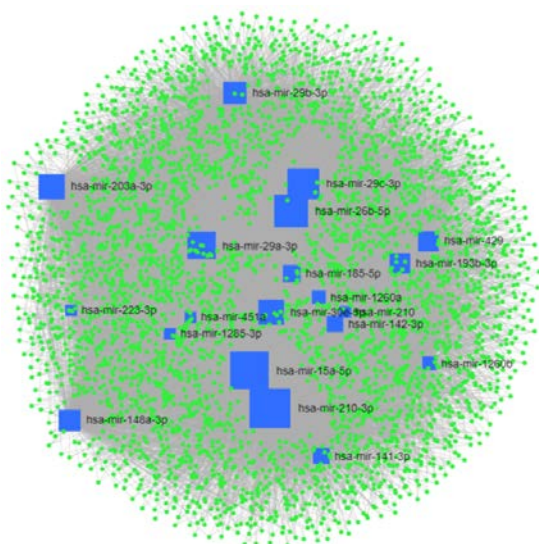


Figura 2. Red de interacción entre miRNAs sobre expresados y genes. Cuadrados azules miRNAs; círculos verdes genes.



Figura 3. Red de interacción entre miRNAs disminuidos y genes. Cuadrados azules miRNAs; círculos verdes genes

Name	Hits	P.val	adj.Pval
p53 signaling pathway	36	1.52E-10	1.52E-08
Protein processing	50	4.57E-08	0.00000229
Cell cycle	47	2.58E-07	0.0000086
Pathways in cancer	88	0.0000896	0.000224
Oocyte meiosis	38	0.0000274	0.000548
Regulation of actin cytoskeleton	56	0.0000372	0.00062
Bladder cancer	14	0.000258	0.00215
Focal adhesion	57	0.000323	0.00244
Apoptosis	27	0.00156	0.00743

Tabla 3. Vías reguladas por miRNAs sobre expresados



Name	Hits	Pval	adj.Pval
Pathways in cancer	139	3.38E-16	3.38E-14
Cell cycle	68	1.89E-13	9.45E-12
Small cell lung cancer	50	3.64E-13	1.21E-11
Prostate cancer	51	7.28E-12	1.82E-10
p53 signaling pathway	42	5.14E-11	1.03E-09
Pancreatic cancer	41	4.89E-10	8.15E-09
Focal adhesion	87	1.22E-09	1.52E-08
Protein processing	53	0.0000177	0.0000843
Apoptosis	36	0.000106	0.000393

Tabla 4. Vías reguladas por miRNAs con expresión reducida.

Conclusiones

En la presente evaluación, se encontraron en total 7,350 genes relacionados con las vías relacionadas a cáncer y p53, ciclo celular, regulación de citoesqueleto, apoptosis adhesión focal, procesamiento de proteínas, entre otras, lo que sugiere que los miRNAs participan en la biogénesis de CaCu.

Referencias

- Gao, C., et al., *MicroRNA expression in cervical cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers*. Journal of cellular biochemistry, 2018. **119**(8): p. 7080-7090.
- Markman, M., *Chemoradiation in the management of cervix cancer: current status and future directions*. Oncology, 2013. **84**(4): p. 246-250.
- Chen, F., et al., *Identification of genes and pathways in nasopharyngeal carcinoma by bioinformatics analysis*. Oncotarget, 2017. **8**(38): p. 63738.
- Wu, D.-M., et al., *Integrated analysis reveals down-regulation of SPARCL1 is correlated with cervical cancer development and progression*. Cancer Biomarkers, 2018. **21**(2): p. 355-365.
- Rajendran, V., R. Purohit, and R. Sethumadhavan, *In silico investigation of molecular mechanism of laminopathy caused by a point mutation (R482W) in lamin A/C protein*. Amino acids, 2012. **43**(2): p. 603-615.
- Rajendran, V., C. Gopalakrishnan, and R. Sethumadhavan, *Pathological role of a point mutation (T315I) in BCR-ABL1 protein—a computational insight*. Journal of Cellular Biochemistry, 2018. **119**(1): p. 918-925.
- Huang, Y., et al., *Biological functions of microRNAs: a review*. Journal of physiology and biochemistry, 2011. **67**(1): p. 129-139.
- Bartels, C.L. and G.J. Tsongalis, *MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer*. Clinical chemistry, 2009. **55**(4): p. 623-631.
- Kamaraj, B., C. Gopalakrishnan, and R. Purohit, *In silico analysis of miRNA-mediated gene regulation in OCA and OA genes*. Cell biochemistry and biophysics, 2014. **70**(3): p. 1923-1932.
- Kulasingam, V. and E.P. Diamandis, *Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies*. Nature clinical practice Oncology, 2008. **5**(10): p. 588-599.
- Zhang, J., et al., *A seven-microRNA expression signature predicts survival in hepatocellular carcinoma*. PloS one, 2015. **10**(6): p. e0128628.