



Integração de lncRNAs em Redes de Coexpressão para o Estudo de Vias Reguladas no Câncer de Mama Triplo-Negativo (TNBC)

Unicamp

Ciência e Visualização de Dados em Saúde

2025

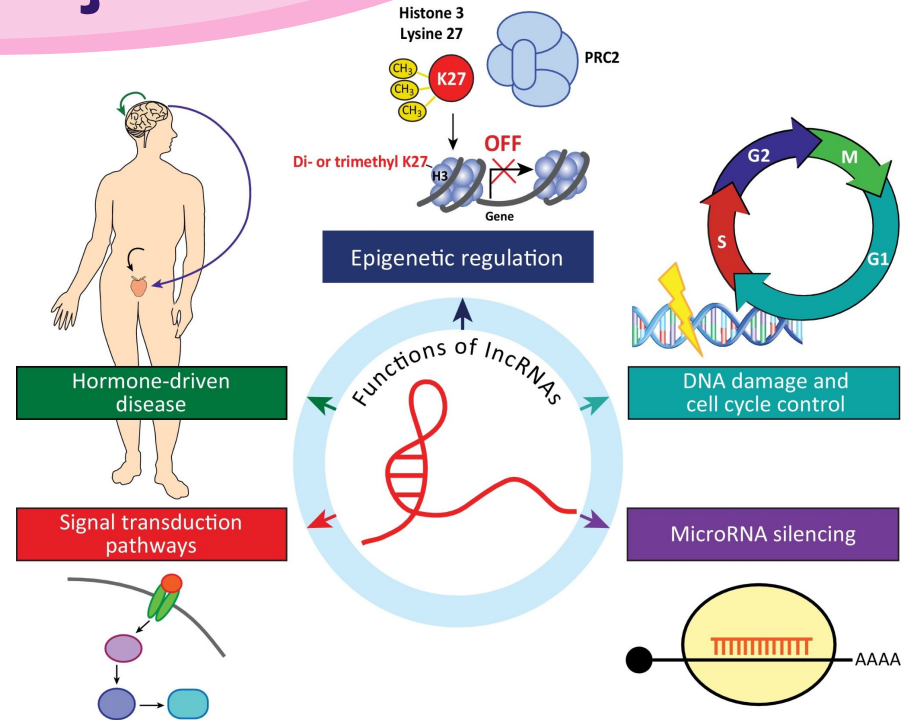
Introdução

Triple-Negative Breast Cancer

Roughly 10%-20% of breast tumors are triple-negative at the time of diagnosis

Cancers that don't express estrogen or progesterone receptors and also lack overexpression of HER2

Chemotherapy after surgery is typically the best treatment option



Trends in Cancer

BT-549: célula epitelial de carcinoma ductal invasivo de mama, derivada de tumor de glândula mamária de uma mulher caucasiana de 72 anos, com metástase em 3 de 7 linfonodos regionais. Câncer de mama triplo negativo (TNBC).

Dataset GSE261989: BT-549



Ativação de:
Glicocorticóides (GR)
com **dexametasona (DEX)**



O receptor de GR está relacionado a genes de sobrevivência e resistência à quimioterapia.

Silenciamento do:
Fator de transcrição (TF) **GATA6**
por **siRNA**



O TF GATA6 é associado à proliferação, invasividade e plasticidade celular.

RNA seq



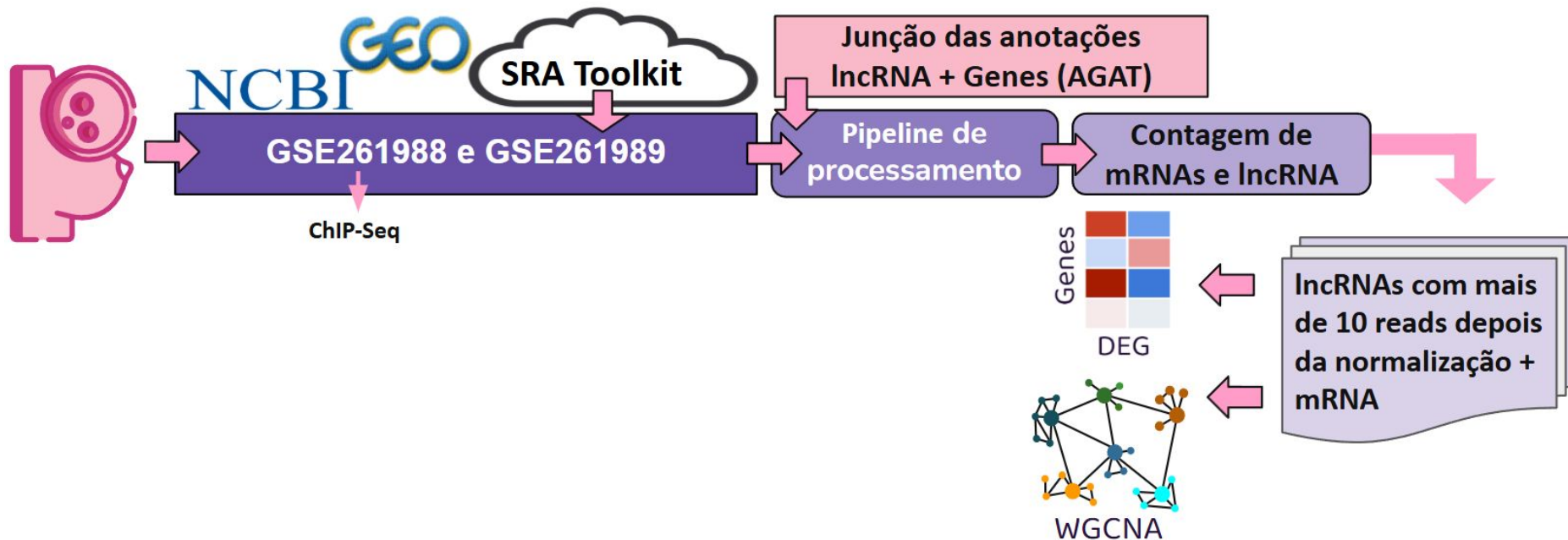
Objetivo

Investigar as vias moleculares moduladas pelo lncRNA em câncer de mama triplo-negativo (TNBC) por meio da ativação do receptor de glicocorticoide (GR) com DEX, do silenciamento de GATA6 via siRNA e da inibição da ATPase SWI/SNF com BRM014, utilizando a linhagem celular BT549.

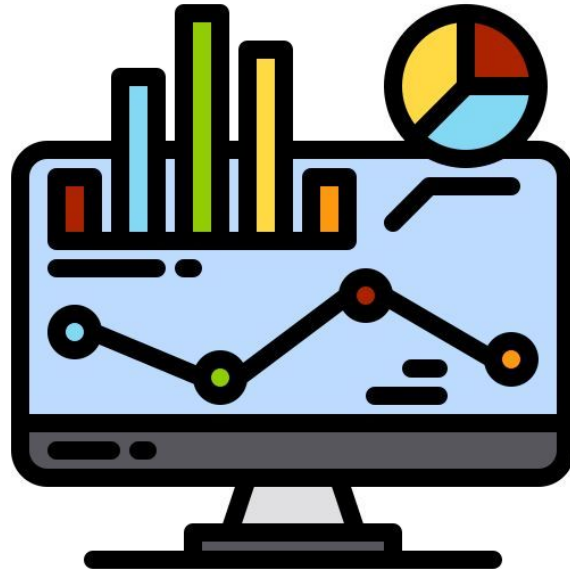
Perguntas Experimentais

- Existem lncRNAs sendo coexpressos com o receptor de glicocorticoide (GR), GATA6, o oncoproteína chave MYC e fatores de transcrição AP-1?
- Os lncRNAs estão presentes em módulos associados aos tratamentos?
- Há lncRNAs identificados como hubs?
- Vias importantes e enriquecidas estão sendo afetadas pela presença de lncRNAs?
- Algum lncRNA está diferencialmente expresso de forma significativa?
- Existem lncRNAs coexpressos com outros lncRNAs?

Metodologia

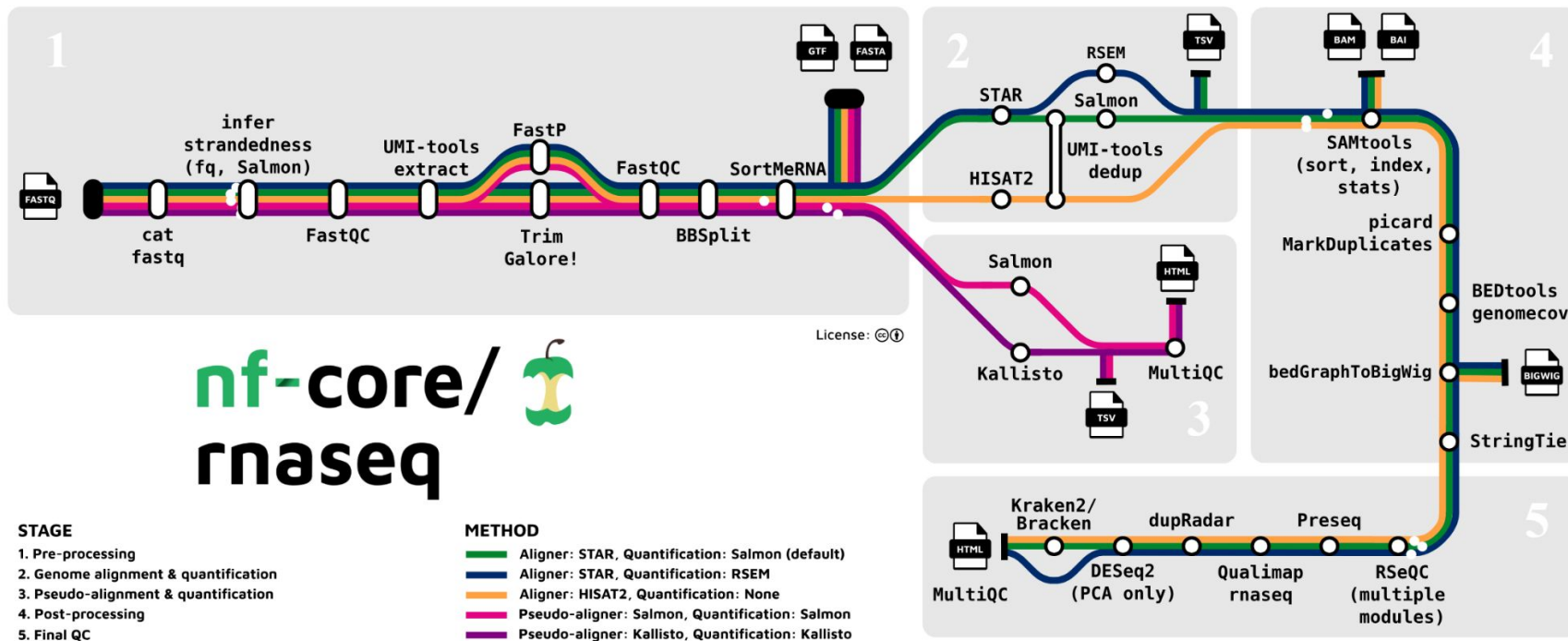


Análise Preliminar



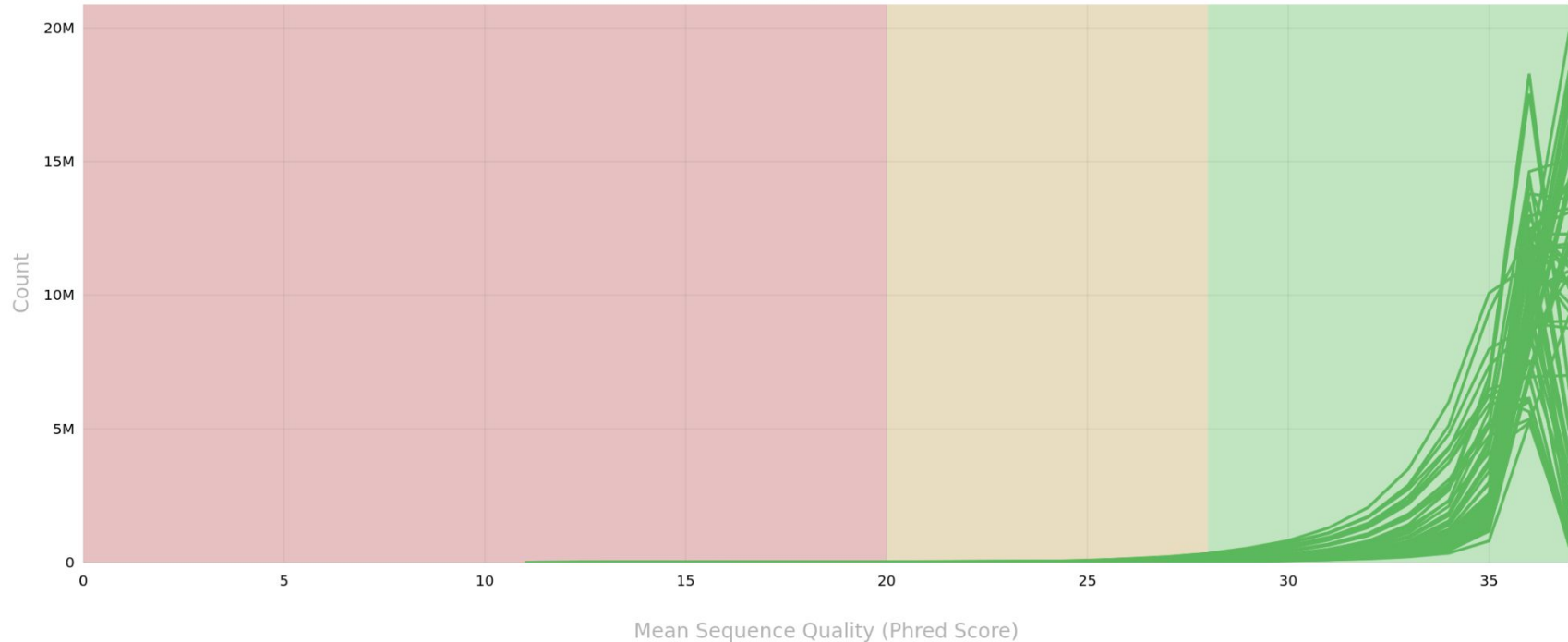
* Foco nos resultados computacionais

Processamento dos dados



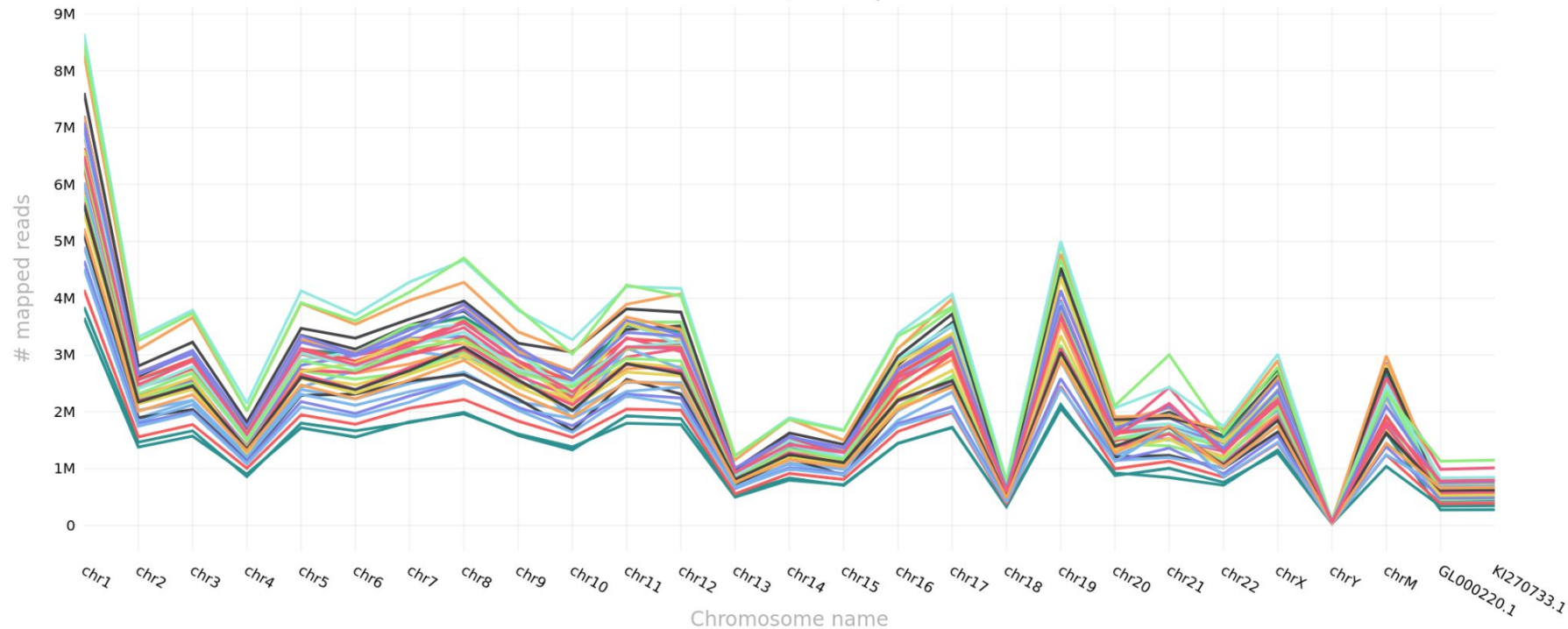
Processamento: Qualidade das amostras

FastQC: Per Sequence Quality Scores
72 samples

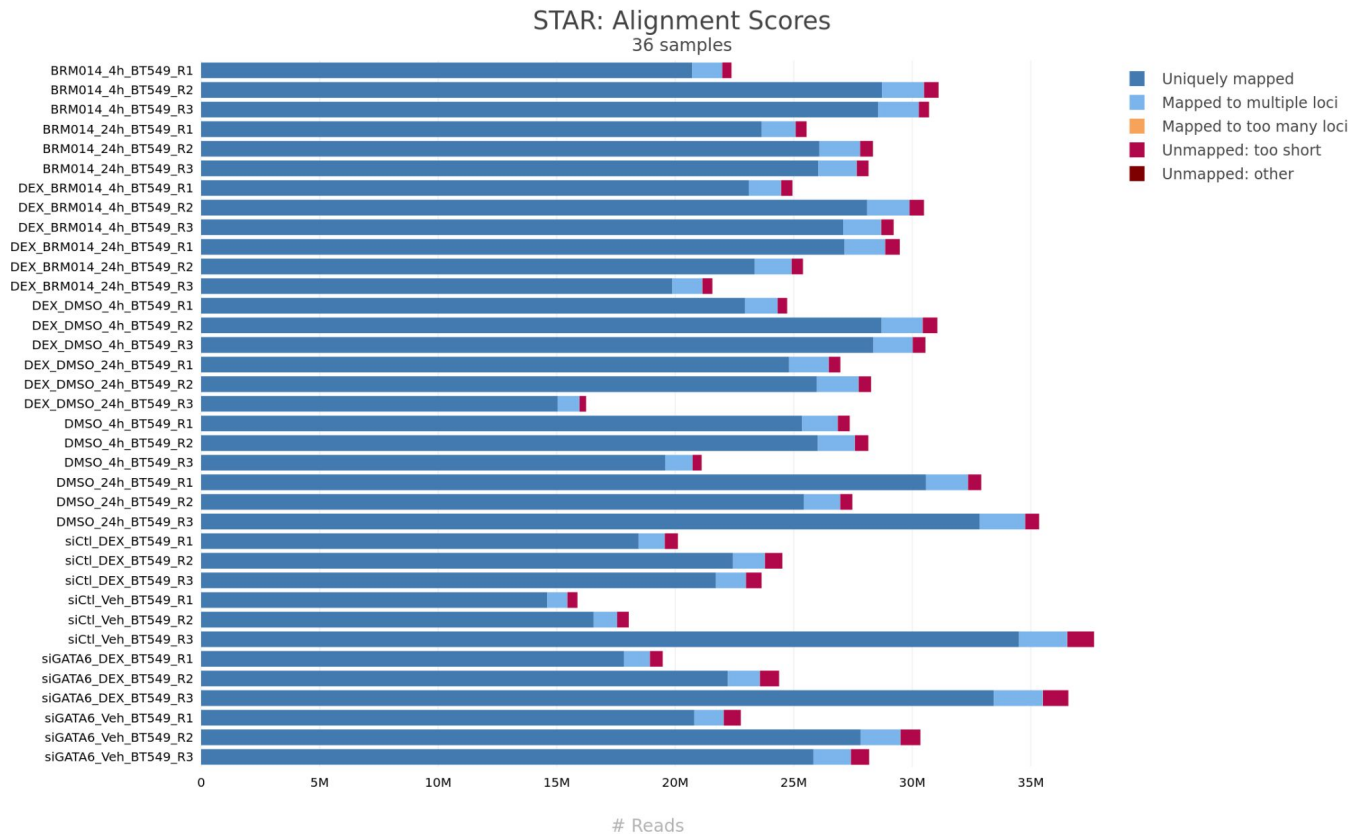


Processamento: Reads por cromossomo

Samtools: idxstats: Mapped reads per contig
Raw Counts, 36 samples

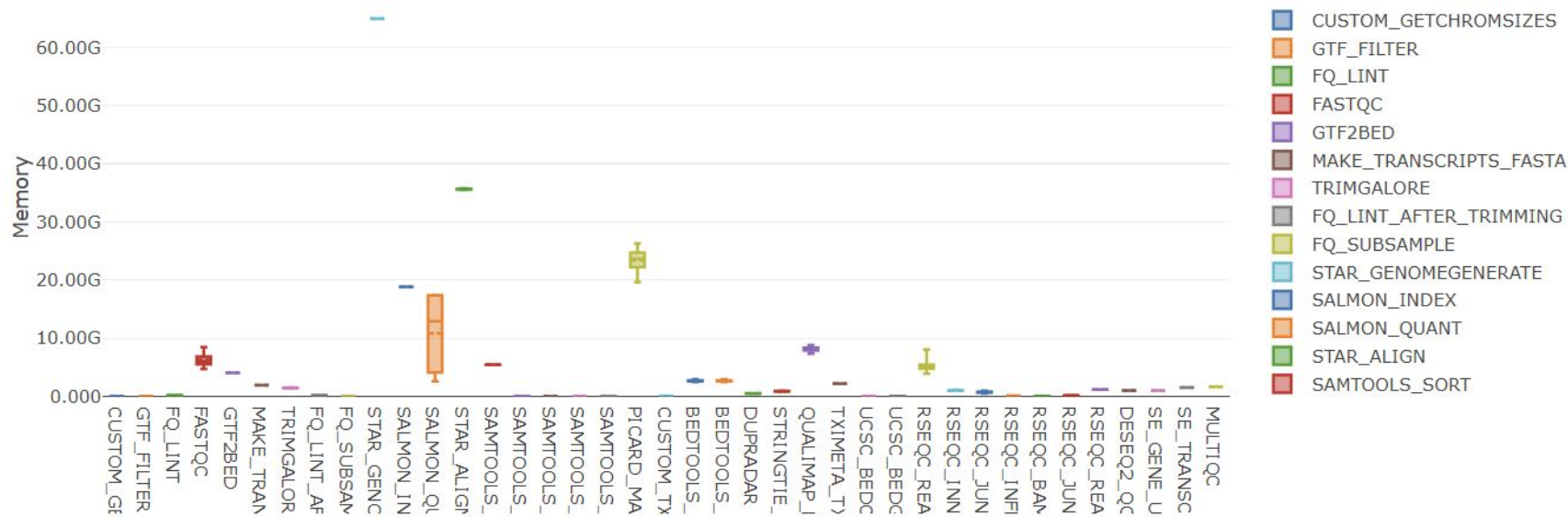


Processamento: Reads alinhadas



Processamento: Custo Computacional

Physical Memory Usage



Processamento: lncRNA

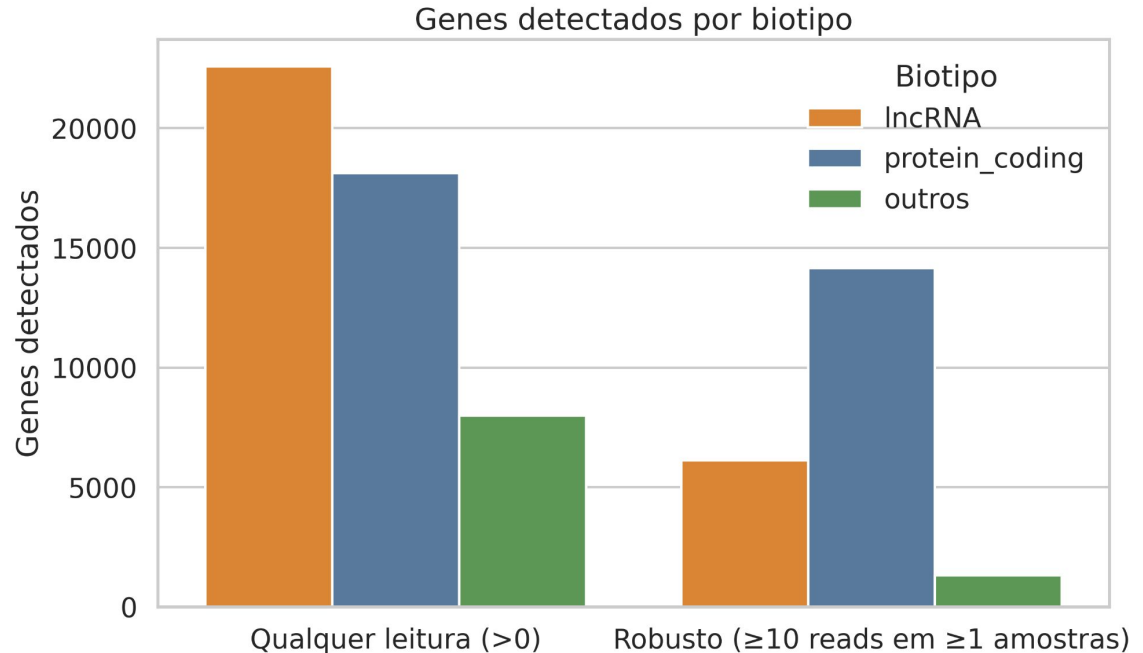
Universo: 83.396 genes na matriz de contagem

Detectados (≥ 1 read em qualquer

- lncRNA: 22.578
- protein_coding: 18.116

Detectados robustos (≥ 10 reads):

- lncRNA: 6.136
- protein_coding: 14.165.



Processamento: Chip-seq

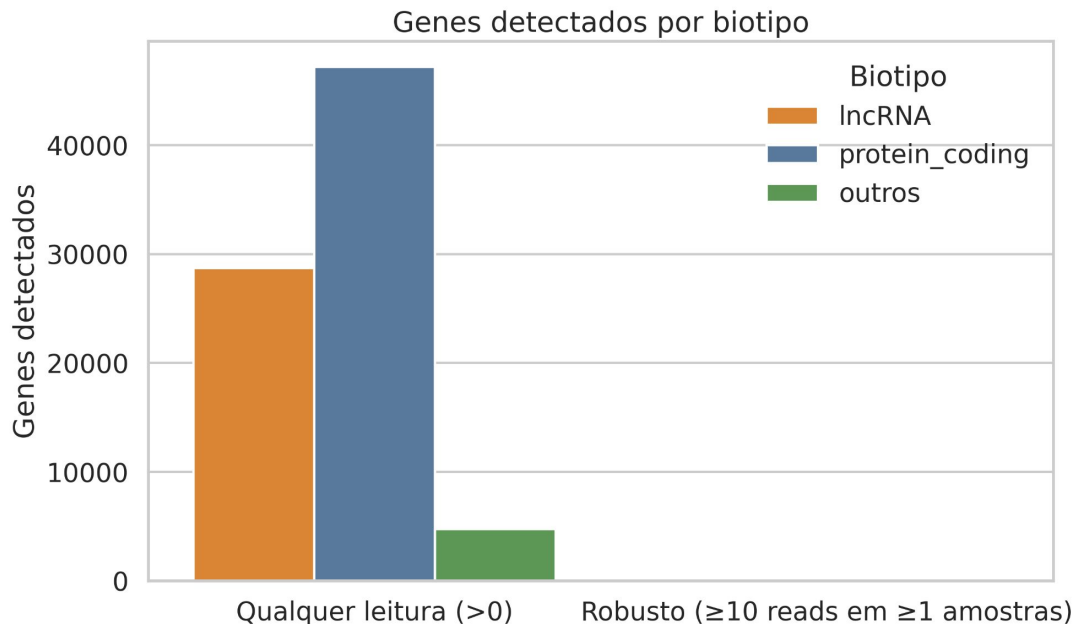
Universo: 313.997 genes na matriz de contagem

Detectados (≥ 1 read em qualquer amostra):

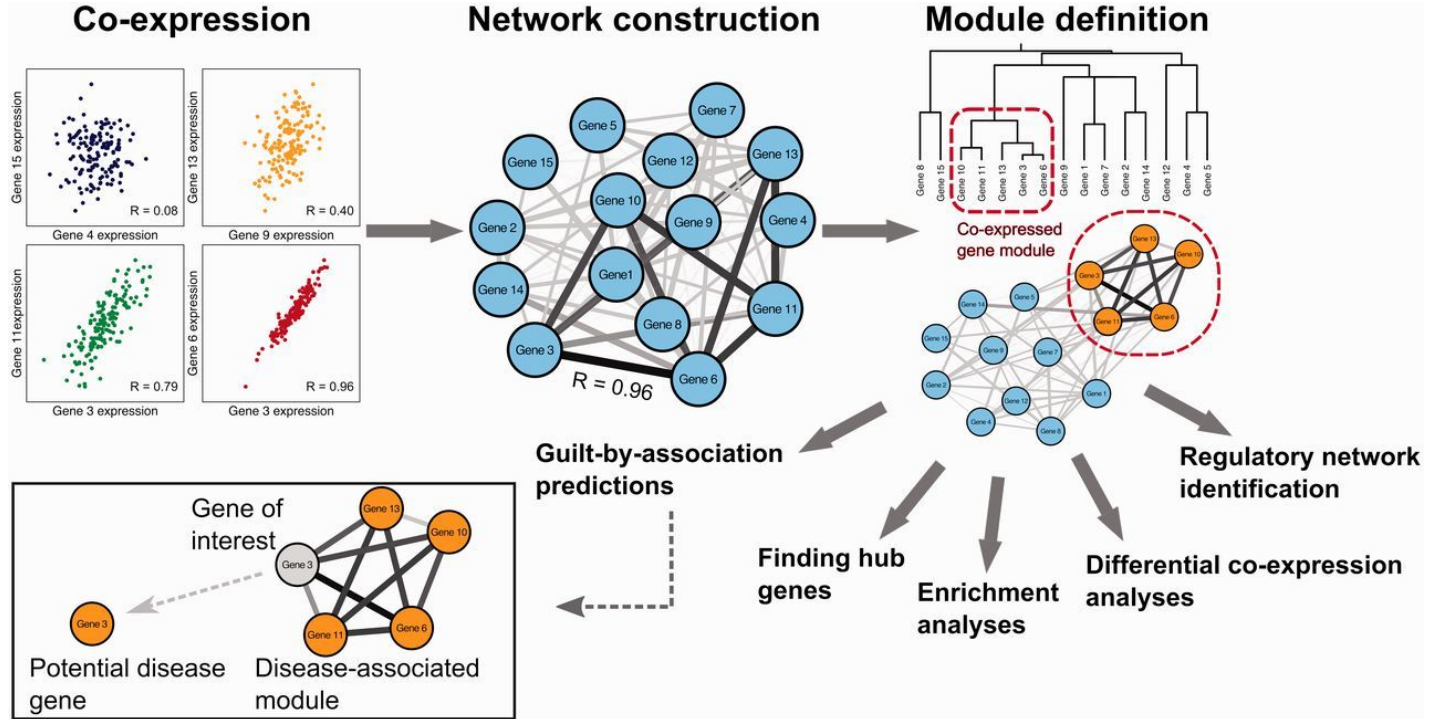
- lncRNA: 28.731
- protein_coding: 47.170

Detectados robustos (≥ 10 reads):

- lncRNA: 37
- protein_coding: 80

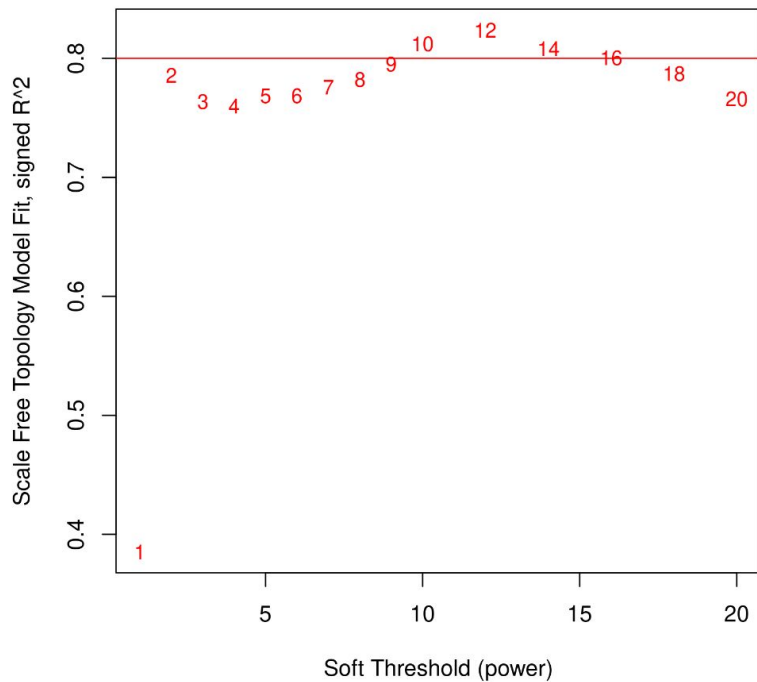


WGCNA

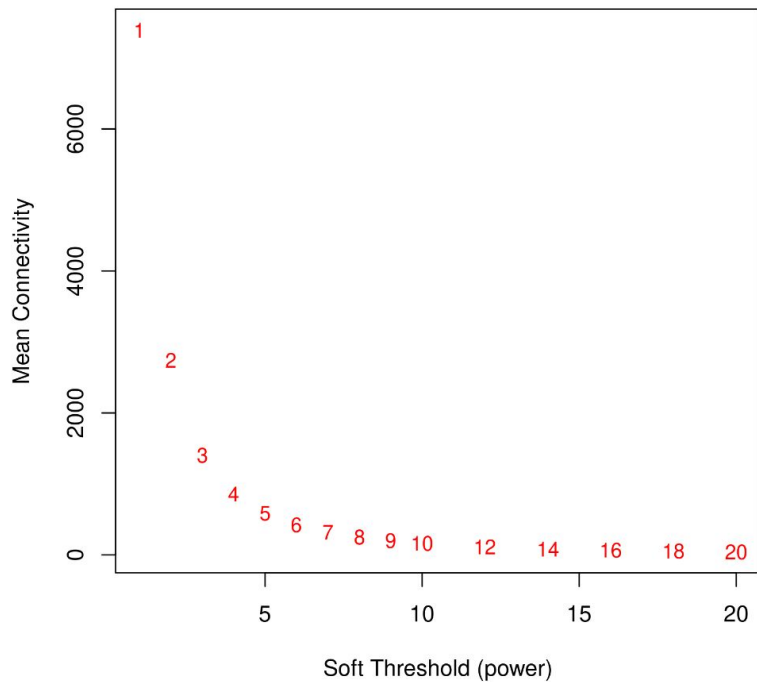


WGCNA: Soft Threshold

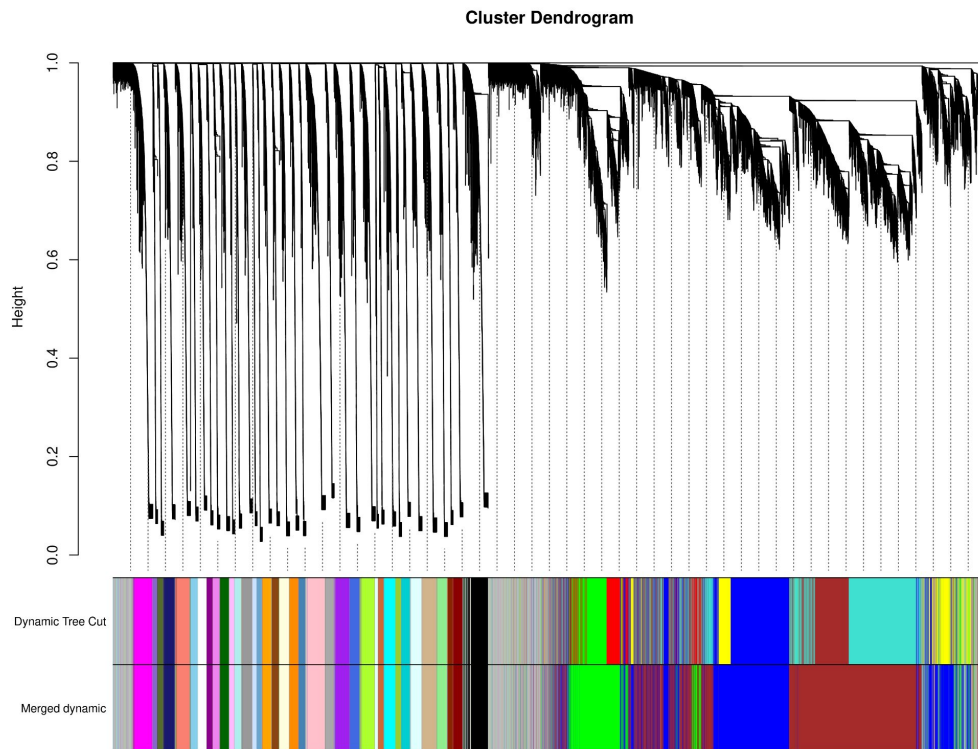
Scale independence



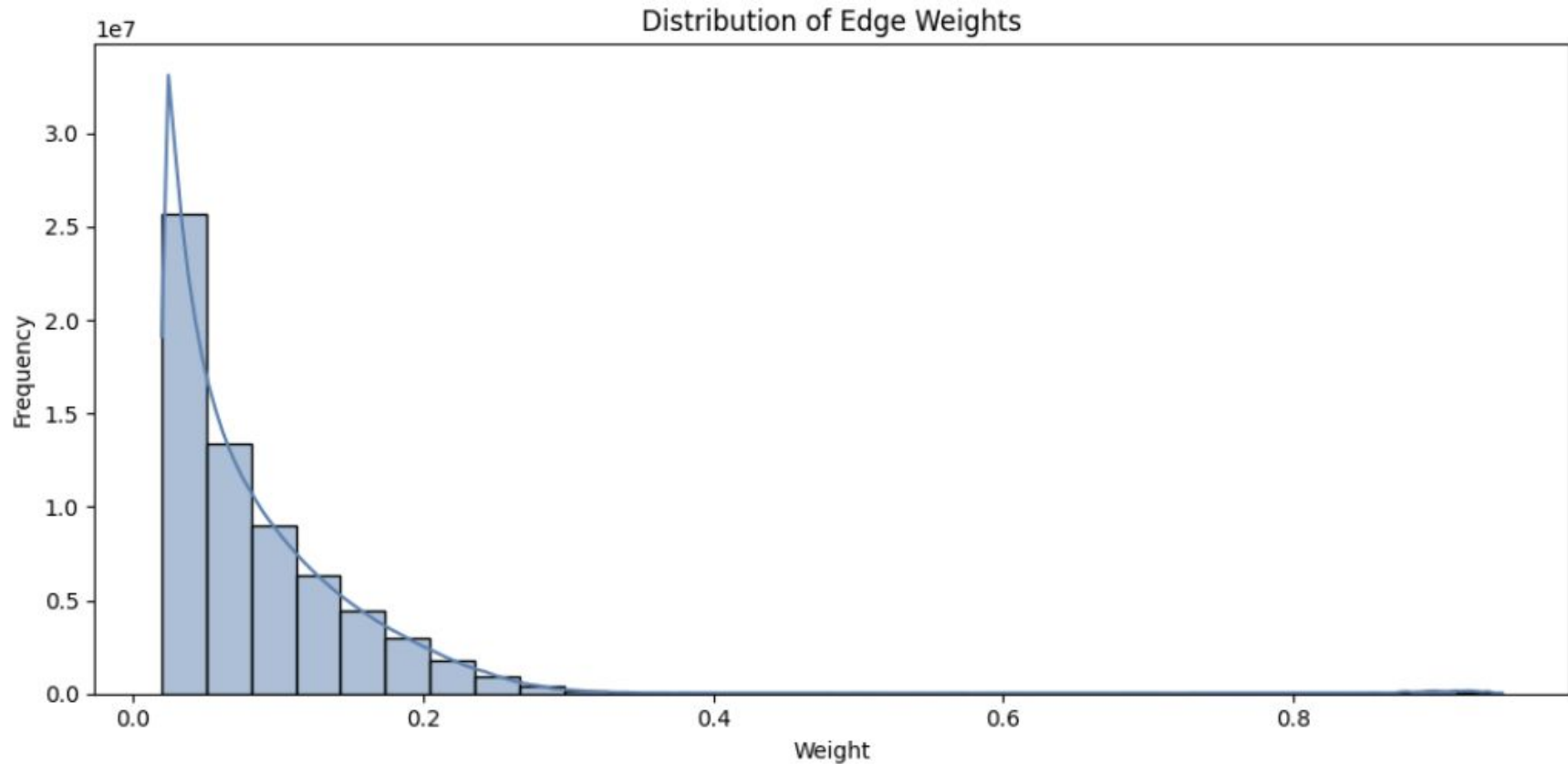
Mean connectivity



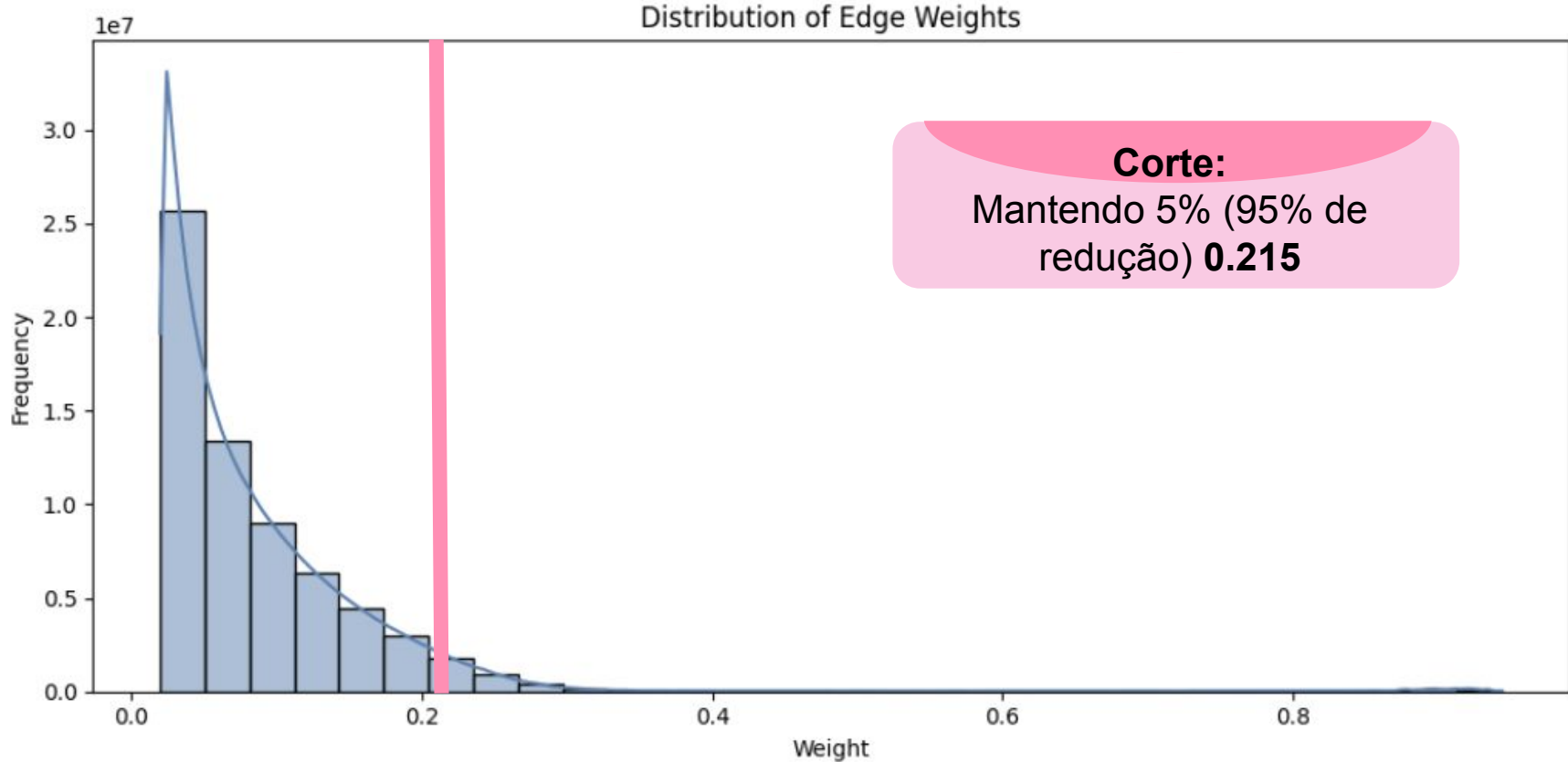
WGCNA: Cluster Dendrogram



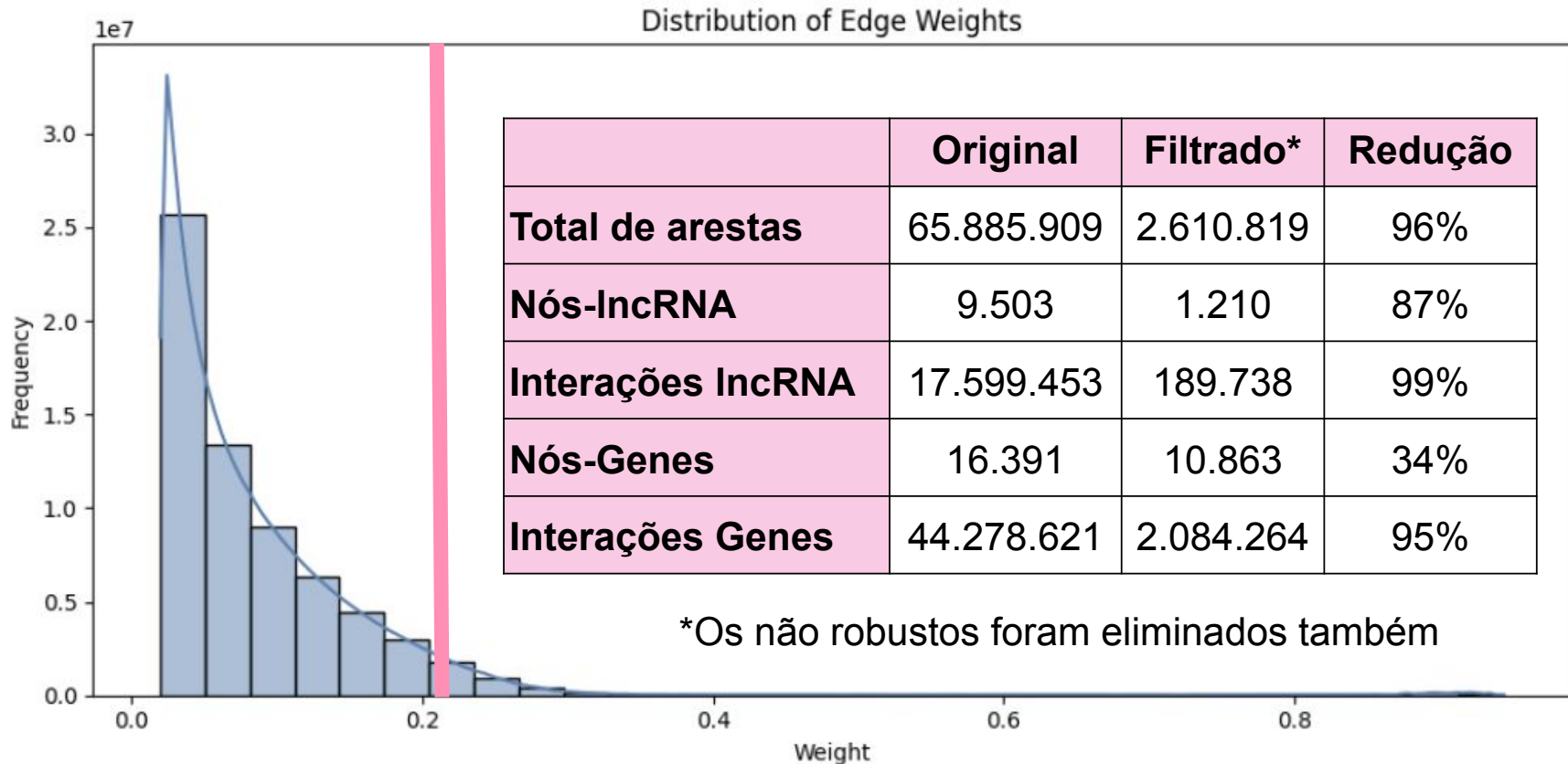
WGCNA: Distribuição das arestas



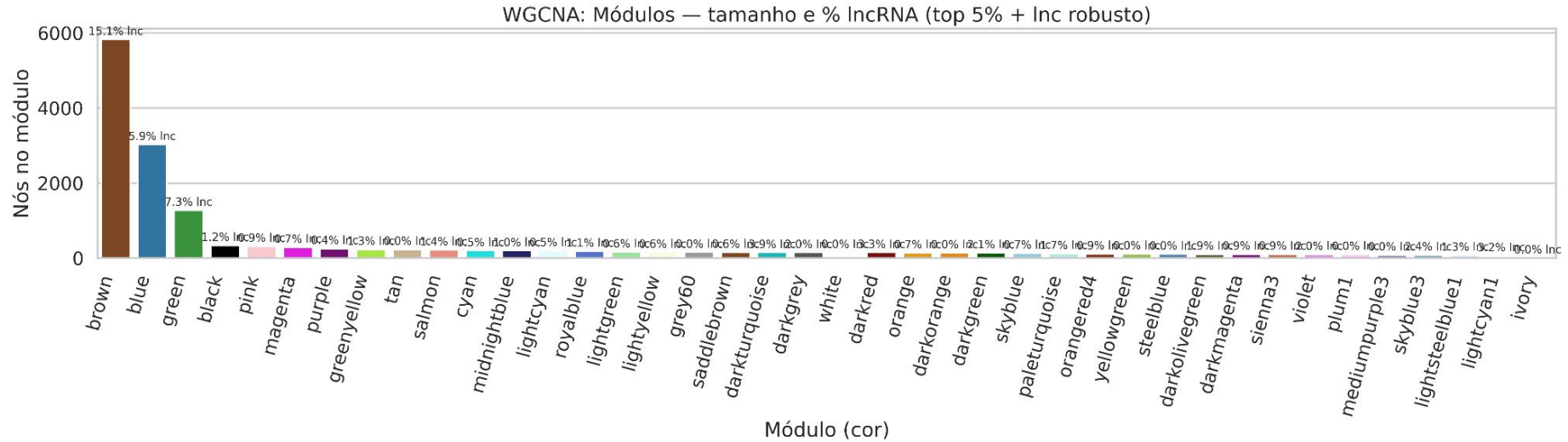
WGCNA: Distribuição das arestas



WGCNA: Distribuição das arestas

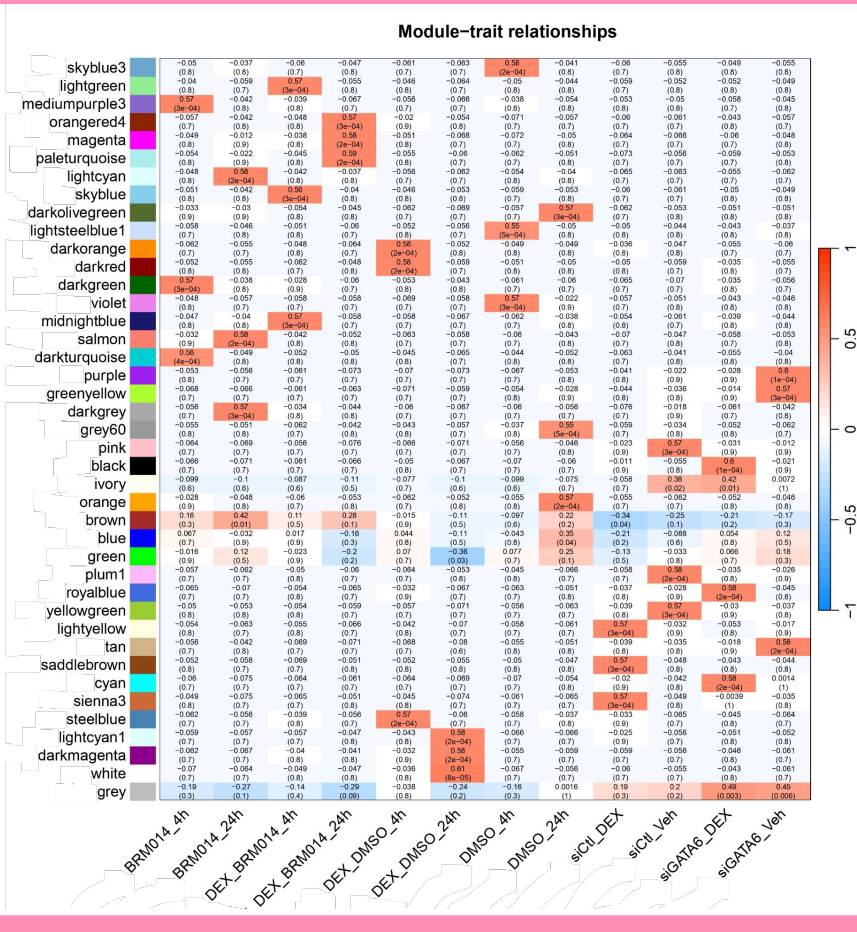


WGCNA: Módulos



40 módulos foram identificados
Todos contendo lncRNAs

WGCNA: Correlação com os módulos



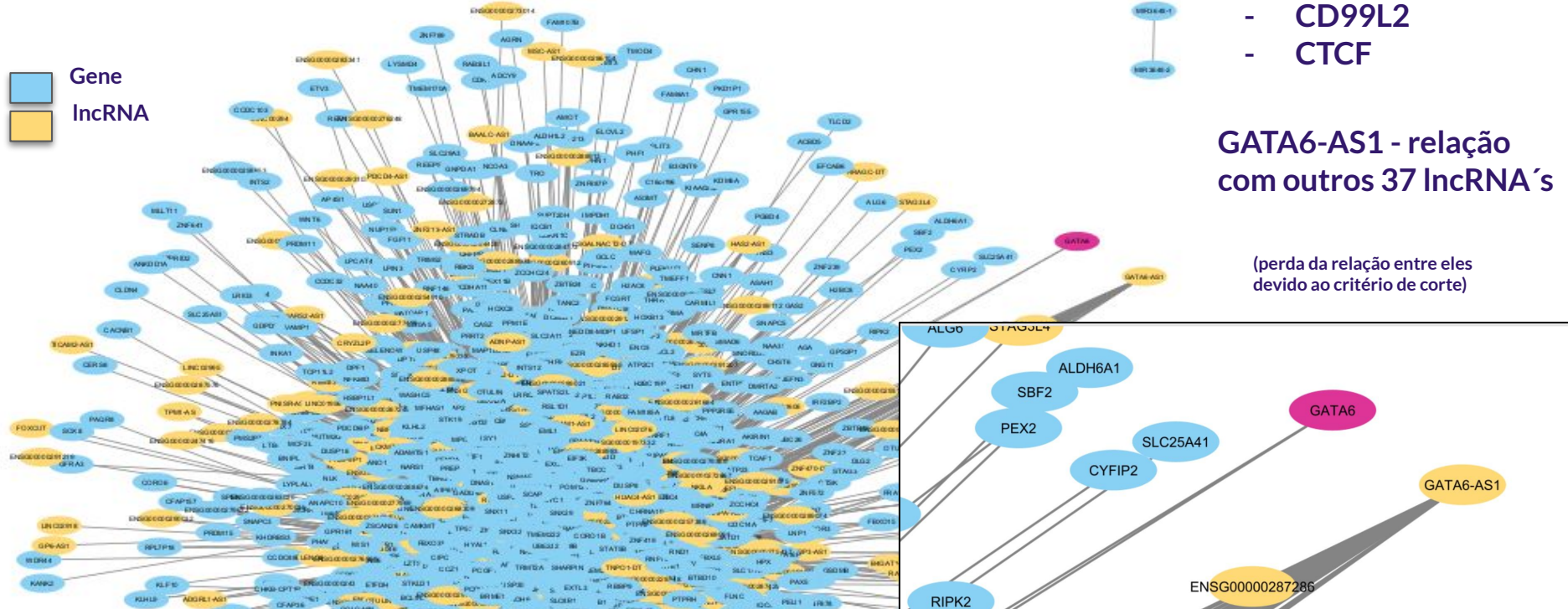
WGCNA: Hubs

Módulo	Gene	Função
BLUE	EWSR1	Proteína de ligação ao RNA
BROWN	RNF10	Regulação positiva da mielinização. Regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase II
CYAN	ADD3-AS1	Encapsulamento de filamentos de actina com extremidade farpada
DARKGREEN	AICDA	Regulação negativa da transposição; desaminação de citosina; edição de citidina para uridina; Desmetilação de DNA
DARKGRAY	AHSP	Proteína estabilizadora da alfa-hemoglobina
DARKMAGENTA	C20orf173	Processo biossintético de gangliosídeo via lactosilceramida
DARKTURQOISE	ACTL6B	Desenvolvimento do sistema nervoso; regulação da transcrição pela RNA polimerase II; acetilação da histona H4
GREEN	PHF20L1	Acetilação de histona; regulação da transcrição pela RNA polimerase II
LIGHTCYAN1	ADAMTS20	Organização da matriz extracelular

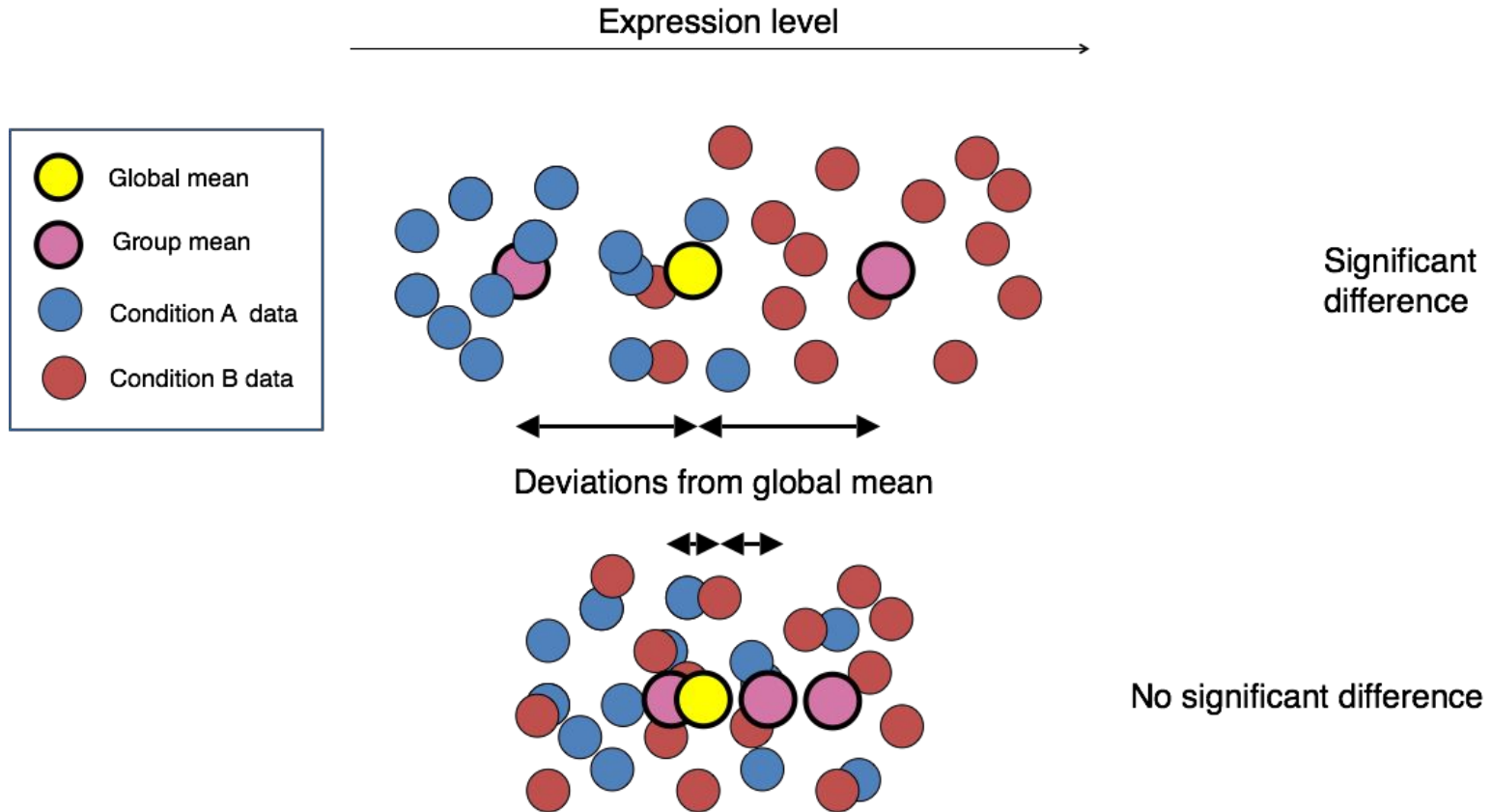
Módulo	Gene	Função
LIGHTSTEELBLUE1	ACER1	Processo biossintético da esfingosina e catabólico de ceramida
LIGHTYELLOW	ADAMTS19-	Organização da matriz extracelular
MAGENTA	ANKFN1	Estabelecimento da orientação do fuso mitótico; regulação do estabelecimento da polaridade bipolar da célula
MIDNIGHTBLUE	APOC4	homeostase dos triglicerídeos; regulação positiva do sequestro de triglicerídeos
PINK	ABCA9-AS1	transporte de lipídios
PLUM1	ADRA1A	Sinalização célula-célula; regulação positiva da cascata MAPK; via de sinalização do receptor acoplado à proteína G ativadora da fosfolipase C;
SADDLEBROWN	ALDH3B2	Processo metabólico do aldeído celular
SKYBLUE	AQP9	Transporte transmembrana de glicerol e água
VIOLET	ADARB2	Edição de adenosina para inosina e processamento de RNA

WGCNA: Módulo marrom (GATA6 e GATA6-AS1)

3929 genes
872 lncRNA



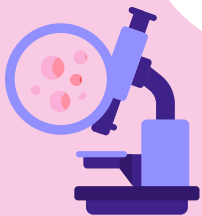
DEG



DEG: Contrastes

- siCtl, Veh vs **siGATA6**, Veh
- siCtl, +DEX vs **siGATA6**, +DEX
- DMSO vs **DEX** + DMSO (4hs e 24 hrs)
- BRM014 vs **DEX** + BRM014 (4hs e 24 hrs)

Dataset GSE261989: BT-549



Controle:

siCtl



siRNA (small interfering RNA) que não tem alvo conhecido no genoma da espécie estudada.

Diluyente:

DMSO



Solvente tóxico

Inibidor:

BRM014



O composto BRM014 inibe o complexo SWI/SNF, um remodelador de cromatina que controla a acessibilidade do DNA e a expressão de múltiplos genes.

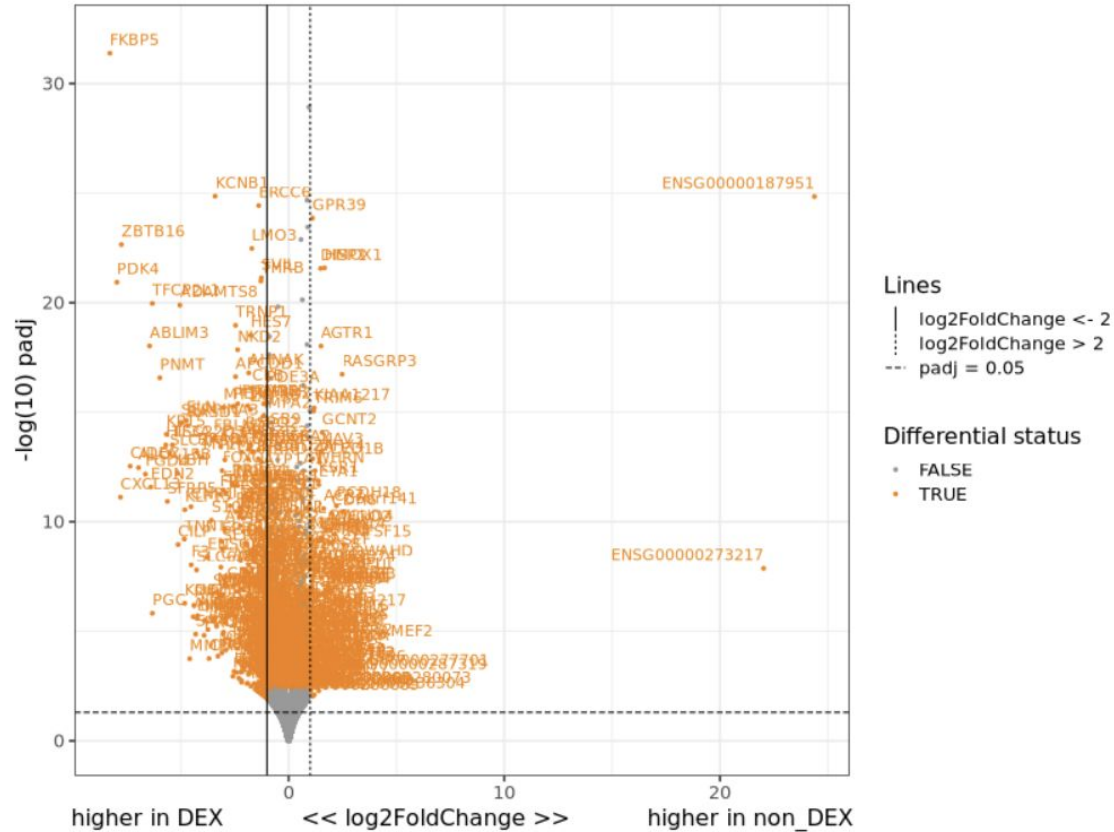
RNA seq



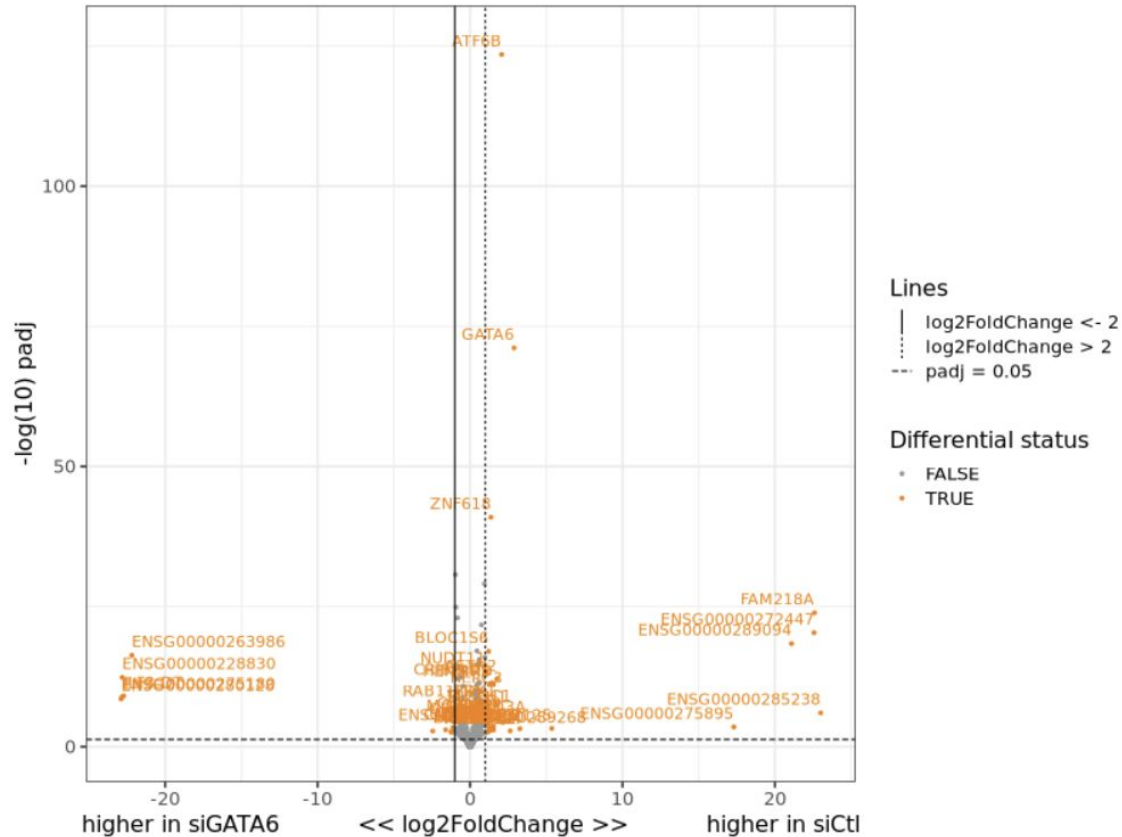
DEG: Contrastes

- siCtl, Veh vs **siGATA6**, Veh
- siCtl, +DEX vs **siGATA6**, +DEX
- DMSO vs **DEX** + DMSO (4hs e 24 hrs)
- BRM014 vs **DEX** + BRM014 (4hs e 24 hrs)

DEG: DEX



DEG: siGATA6



Dificuldades

Processamento

- Tempo de execução
- Poder computacional
- Erros diversos
 - Formato dos arquivos: Precisam estar compactados
 - Formatação da samplesheet
 - Arquivos corrompidos

WGCNA

- Arquivo de Edges muito grande
- Critério de corte de peso entre arestas arbitrário
- Visualização no cytoscape

DEG

- Determinação dos contrastes

Conclusão

Próximas Etapas

- Enriquecimento funcional dos módulos.
- Integração da co-expressão, expressão diferencial e chIP-seq.
- Predição das funções de lncRNA por associação (guilt-by-association).
- Identificação das vias canônicas afetadas pela adição dos lncRNA.
- Definir um programa de predição de interação entre molecular pelo cálculo de energia para avaliar mRNA e lncRNA
- Tirar dúvidas sobre o Chip-seq com o professor Murilo

lncRNA <> Chip-seq

Sobreposição: ChIP-seq (robusto) × RNA-seq lncRNA (robusto)

