

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Luís Henrique Trentin de Souza

Assinatura Transcricional de Tumores Gliais

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Luís Henrique Trentin de Souza

Assinatura Transcricional de Tumores Gliais

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Instituto de Biociências da
UFRGS em preenchimento parcial dos
requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Luís Henrique Trentin de Souza

Assinatura Transcricional de Tumores Gliais

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Instituto de Biociências da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Comissão Examinadora:

Profª Dra. Ana Maria Oliveira Battastini
Departamento de Bioquímica - UFRGS

Prof. Dr. Diego Bonatto
Instituto de Biotecnologia – UFRGS

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira
Departamento de Bioquímica - UFRGS

Porto Alegre

2012

A minha família e amigos, que de perto ou longe, foram parceiros nesta caminhada.

“Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser... é preciso questionar o que se aprendeu. É preciso ir tocá-lo”.

Amyr Klink

DICIONÁRIO DE TERMOS E ABREVIações

A – Astrocitoma.

ATP – Trifosfato de Adenosina.

CL – Classe (denominadora de grupos e.g. CL9).

DNA – Ácido Desoxiribonucleico.

ES – “Enrichment Score” – Valor de Enriquecimento do GSEA.

GBM – Glioblastoma Multiforme.

GEO – *Genome Expression Omnibus*.

GO – *Gene Ontology*.

GS – “Gene Set” – Grupo de Genes.

GSEA – “*Gene Set Enrichment Analysis*” – “Análise de enriquecimento de grupos de genes”.

HOPACH - “*hierarchical ordered partitioning and collapsing hybrid*” – “Particionamento ordenado hierarquicamente e junção de híbridos”

INCA – Instituto Nacional do Cancer.

MMP – Metaloproteinases de Matriz.

mRNA – “Messenger RNA”. – RNA Mensageiro

NADP – Dinucleotídeo Nicotinamida-Adenina Fosfato.

NFKB – Fator nuclear de transcrição Kappa B.

OA – Oligoastrocitoma.

OD – Oligodendrogloma.

OMS – WHO – Organização Mundial de Saúde – “World Health Organization”.

PA – Astrocitoma Pilocítico.

R – Ambiente Estatístico.

Rede/Grafo – Diagrama de Interação.

RMA – Robust Microarray Analysis – Metodologia de normalização de microarranjos de expressão gênica.

RNA – Ácido Ribonucleico.

TNF – Fator de Necrose Tumoral.

TP53 – Proteína supressora de Tumor P53.

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figuras:

Figura 1: Distribuição dos valores de modularidade e distinção dos módulos do ordenamento de proteínas de Homo sapiens para uma janela de 251 genes.	12
Figura 2: Representativo do método do GSEA:	15
Figura 3: Diagrama de interação referente aos processos de apoptose e estabilidade genômica.	17
Figura 4: Diagrama de interação do genes que interagem com a rota do fator nuclear de transcrição Kappa-B (NFkB).	18
Figura 5: Diagrama de interação parcial dos genes transcritos pelo NFkB.	19
Figura 6: Diagrama de interação dos genes do metabolismo energético.	20
Figura 8: Diagrama de interação dos genes relacionados com a sobrevivência de tumores, defesas antioxidantes, Glicólise e subunidades do Fator Nuclear de Transcrição Kappa B (NFkB).	21
Figura 9: Composição de cada um dos grupos definidos pela análise, quanto aos tipos histológicos de tumor.	23
Figura 10: Sobreposição do Transcriptograma de todos os grupos.	24
Figura 11: Painel de Transcriptogramas representativos de cada classe.	25
Figura 12: Número de GS enriquecidos em cada um dos grupos, com relação ao grupo controle (Valor $P < 0,001$).	26
Figura 13: Escala de cor dos valores de enriquecimento de GS relacionados com a aquisição de capacidades biológicas tumorais	30
Figura 14: Rede de genes diferencialmente expressos em CL9.	32
Figura 15: Rede de genes diferencialmente expressos em CL16.	34
Figura 16: Rede de genes diferencialmente expressos em CL17.	36
Figura 17: Rede de genes diferencialmente expressos em CL18.	38
Figura 18: Rede de genes diferencialmente expressos em CL22.	40
Figura 19: Rede de genes diferencialmente expressos em CL23.	42
Figura 20: Panorama transcricional da rede apoptose e estabilidade genômica.	45
Figura 21: Panorama transcricional da rede de genes que interagem com fator de transcrição NFkB.	46
Figura 22: Panorama transcricional da rede de genes transcritos pelo NFkB.	47
Figura 23: Panorama transcricional da rede do metabolismo energético.	48
Figura 24: Panorama transcricional da rede composta por: genes do fator de transcrição NFkB, genes de sobrevivência, glicólise e resposta a estresse.	49

Tabelas:

Tabela 1: Processos biológicos predominantes em 10 dos 19 módulos do ordenamento de proteínas de Homo sapiens para uma janela de 251 genes.	13
Tabela 2: Informações clínicas de cada uma das classes: Idade Mediana e sobrevida mediana.	22
Tabela 3: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL9.	27
Tabela 4: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL16.	27
Tabela 5: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL17.	28
Tabela 6: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL18.	28
Tabela 7: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL22.	29
Tabela 8: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL23.	29
Tabela 9: Número de vértices e arestas de cada um dos diagramas de interação dos genes superexpressos em cada classe.	33
Tabela 10: 20 termos mais significativos na análise de ontologia das redes de genes diferencialmente expressos por CL9.	35
Tabela 11: 20 termos mais significativos na análise de ontologia das redes de genes diferencialmente expressos por CL16	37
Tabela 12: 20 termos mais significativos na análise de ontologia das redes de genes diferencialmente expressos por CL17.	39
Tabela 13: 20 termos mais significativos na análise de ontologia das redes de genes diferencialmente expressos por CL18.	41
Tabela 14: 20 termos mais significativos na análise de ontologia das redes de genes diferencialmente expressos por CL22.	43
Tabela 15: 20 termos mais significativos na análise de ontologia das redes de genes diferencialmente expressos por CL23.	45

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Gliomas.....	3
Biologia de tumores.....	4
Expressão Gênica e Microarranjos.....	6
Biologia de Sistemas.....	7
Justificativa	8
Objetivos	9
Objetivo Geral.....	9
Objetivos Específicos.....	9
Metodologia	10
Coleta dos Dados de Expressão Gênica.....	10
Análise de Agrupamento.....	11
Assinatura Transcricional – Transcriptograma.....	11
Análise de Expressão Diferencial.....	14
Análise de Enriquecimento de Grupos de Genes (GSEA)	14
Análise de Enriquecimento Funcional.....	16
Panorama Transcricional de Redes Funcionais.....	17
Resultados	22
A análise de agrupamento definiu 6 grupos.....	22
A assinatura transcricional é diferente em cada uma das classes	24
Os grupos de tumores diferem, na expressão gênica, quanto a intensidade e o número de grupos de genes com expressão alterada.....	26
As redes diferencialmente expressas em cada um dos grupos difere quanto a sua complexidade.....	31
As Alterações Tumorais Repercutem no Funcionamento de Redes Gênicas Relativas a Processos Biológicos.....	44
Discussão	50
Conclusão	54
Conclusões gerais.....	54
Conclusões pontuais.....	55
Perspectivas	56
Bibliografia	57

RESUMO

Gliomas são tumores bastante agressivos que acometem o sistema nervoso. Devido a agressividade destes tumores, e a função vital desempenhada pelo cérebro, via de regra, repercutem em uma baixa sobrevida. Portanto são necessários estudos que venham a compreender os processos biológicos relacionados com a sobrevivência destes tumores. Alterações nestes processos podem ser inferidas a partir de diferenças na expressão dos genes destas células. Este trabalho avaliou a expressão gênica de 254 biópsias de tumores gliais humanos, por meio de ferramentas de biologia de sistemas capazes de interpretar a grande quantidade de dados gerada pelos microarranjos de expressão gênica. Verificaram-se semelhanças no perfil de expressão gênica de tumores de origem histológica diferente, o que motivou uma definição de grupos quanto ao seu perfil transcricional. Foram definidos 6 grupos, cada um composto por tumores de diferentes histologias, os quais diferiam quanto a sua atividade transcricional, tanto em nível global, quanto em nível de processos biológicos (onde analisou a expressão dos genes atuantes nestes processos). Observou-se que, em tumores mais agressivos, as alterações transcricionais são mais proeminentes, e repercutem no número de processos biológicos alterados e no grau de alteração destes processos. Estas alterações têm impacto sobre o funcionamento de mecanismos celulares responsáveis pela aquisição do fenótipo tumoral: como alterações no metabolismo energético, nos mecanismos de morte e na ativação do reparo genômico. Verificaram-se alterações na expressão de genes relacionados com estas atividades, bem como a ativação de rotas de resposta a estresse, como a expressão de genes antioxidantes e de sobrevivência, relacionados ao fator de transcrição NFkB cuja atividade foi identificada em todos os grupos, ainda que diferindo ligeiramente quanto a seu perfil de ativação dos seus alvos. A compreensão da biologia do tumor por meio de seu perfil transcricional é, portanto, uma potente ferramenta na prospecção de alvos para terapias antitumorais.

ABSTRACT

Gliomas are aggressive tumors that affect the nervous system. The impairment of this system by neoplasias may have a role in the poor prognosis associated to this disease. Therefore, studies are needed to understand the biological processes related to tumor survival. Impairments in these processes can be inferred from the differences in gene expression profiles from tumor cells to normal ones. In this work, we accessed the gene expression profiles of 254 human glial tumors biopsies towards systems biology tools, capable of analyzing the vast amount of data generated by Gene expression Microarrays. We identified similar gene expression profiles in tumors of different histological origins. Thus, we used these expression profiles to define (6) clusters of patients by the similarity of their gene expression profiles. We also accessed the transcriptional signatures for each cluster. These clusters differed on transcriptional activity, either in the global gene expression profile, or in gene networks related to some biological processes. We observed that the most aggressive tumors are more different from the control values than the milder ones. This impairment also reflects in the number of affected processes and the intensity of change. This gives rise to impairment of biological processes related to tumorigenic processes *e. g.* reprogramming of energy metabolism, impairments on cell death mechanisms and activation of genome repair pathways. We identified changes on gene expression patterns of these paths. We also identified the activation of the expression of genes related to stress response – antioxidant and survival genes, related to the transcription factor Kappa-B which was found to be activated in all clusters, perhaps these clusters have slight differences on their transcriptional patterns. Therefore, the understanding of tumor's biology by means of their transcriptional profile is a powerful tool on prospecting antitumor therapies.

INTRODUÇÃO

Gliomas:

Gliomas malignos, em adultos, correspondem a cerca de 60% dos aproximadamente 8461 novos casos de tumores cerebrais malignos primários registrados no ano de 2008 no Brasil (INCA 2012). São tumores bastante agressivos, com uma razão mortalidade/incidência de cerca de 92% para o Brasil (INCA 2012), o que se deve a ausência de uma terapia curativa e a localização vital destes tumores que, além de comprometer as funções da região do sistema nervoso onde ele se encontra, causam aumento da pressão intracraniana (efeito de massa), que somados a outros fatores, implicam nas dores de cabeça, convulsões, náuseas e vômitos e outros sintomas associadas à esta patologia.

As modalidades terapêuticas mais efetivas no prolongamento da sobrevivência dos portadores deste tipo de neoplasia são a cirurgia para ressecção tumoral, a radioterapia craniana total e a quimioterapia (STEWART, 2002). Apesar da combinação destas terapias, a sobrevivência média após o diagnóstico não costuma ultrapassar 18 meses (GROSSMAN, 2010).

Gliomas são clinicamente categorizados por meio de análise histopatológica, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando parâmetros morfológicos: o tipo é dado pelas células de origem (*i.e.* Astrócitos – Astrocitoma; Oligodendrócitos – Oligodendroglioma; misto Oligodendrócitos e Astrócitos – Oligoastrocitoma; ou Glioblastoma, como o estágio mais transformado) e a graduação, de I a IV, enumerando as seguintes características morfológicas apresentadas pelo tumor: Atipia celular, Mitose, Proliferação de Endotélio e Necrose. Estas características geralmente estão relacionadas com a agressividade destes tumores, sendo que tumores que apresentam três (Grau III) a todas (quatro) estas quatro características (Grau IV) via de regra são mais agressivos que tumores Graus II e I.

Biologia de Tumores

O processo de estabelecimento de uma neoplasia requer a aquisição de uma série de capacidades que permitem que as células tumorais sobrevivam, proliferem e resistam aos insultos proferidos pelo sistema imunitário e à hostilidade do microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A instabilidade cromossômica é um importante processo gerador de variabilidade genética em tumores (CASTRO, 2007) e, juntamente com alterações epigenéticas, governam mudanças fenotípicas que serão determinantes no sucesso destas células transformadas no microambiente tumoral, seguindo princípios da seleção Darwiniana (KHONG; RESTIFOU, 2006).

A resposta inflamatória é um fator bastante relevante nos processos neoplásicos e surge da interação das células do sistema imunitário com células transformadas, na tentativa de eliminá-las do organismo. Ainda que a inflamação seja um mecanismo eficiente de eliminação de células em estágio inicial de transformação, algumas células cancerosas são capazes de, não somente resistir à agressão, como também utilizar-se do ambiente pró-inflamatório em benefício próprio (CORDON-CARDO; PRIVES, 1999), recrutando e induzindo células do sistema imunitário a secretar fatores de crescimento necessários à progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Um dos ataques promovidos por células da microglia – equivalentes do sistema imunitário no sistema nervoso central - é a secreção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um forte agente oxidante, ao qual algumas células respondem aumentando a expressão de genes de defesa antioxidantes, na tentativa de minimizar os danos, enquanto o ambiente pró-oxidativo, muitas vezes, passa a agir como indutor de proliferação, por meio da ativação de vias de resposta a espécies reativas (VEAL, 2007).

A condição proliferativa de uma célula tumoral requer uma reprogramação metabólica da célula, de maneira a satisfazer suas demandas energéticas e de biomassa. Ainda que alterações na demanda por glicose, produção de ácido láctico e consumo de Oxigênio em células cancerosas tenham sido descritas ao final da década de (19)20 por Otto Warburg, as bases moleculares deste fenômeno

começaram a ser exploradas somente a partir dos anos 2000, onde começou-se também a dar uma maior atenção ao microambiente tumoral, e se estabelecer as primeiras relações entre processos biológicos como angiogênese, inflamação e estresse oxidativo – e parâmetros extracelulares (MELILLO; SEMENZA, 2006).

Na revisão “*The Hallmarks of Cancer*” publicada no periódico *Cell* no ano 2000, Hanahan & Weinberg postulam seis capacidades biológicas adquiridas durante as várias etapas de desenvolvimento de patologias neoplásicas. Estas capacidades servem de referência para o entendimento da complexidade do processo de transformação tumoral. Compreendem a “Manutenção de sinalização proliferativa”, “resistência a supressores de crescimento”, “resistência aos mecanismos de morte celular”, “habilidade de imortalidade replicativa”, “indução de angiogênese” e “ativação de invasão e metástase”. Na reedição deste trabalho, publicada no mesmo periódico, no ano de 2011 - “*the hallmarks of cancer: the next generation*”, os autores sugerem mecanismos adicionais que suportam estas capacidades: A “instabilidade cromossômica” que estaria por trás da geração de diversidade genética, pode levar a alterações nos demais metabolismos da célula, acelerando a aquisição destas capacidades, que serão submetidas a seleção no microambiente tumoral. A Inflamação, que tem um importante papel na promoção destas capacidades. A “reprogramação” do metabolismo energético, frente a nova condição e a capacidade que estas células possuem de escapar da destruição pelo sistema imunitário e de recrutar células não tumorais que constituirão o microambiente tumoral – também contribuindo para a aquisição dos demais atributos.

Expressão Gênica e Microarranjos

Alterações no metabolismo são consequências da reestruturação da maquinaria celular, governada por vias de sinalização que atuam na regulação da produção de proteínas. A transcrição gênica é a etapa inicial no processo de síntese proteica. É um processo altamente dispendioso do ponto de vista energético, sendo, portanto, o principal alvo de regulação de vias de sinalização. Com o crescente avanço tecnológico da biologia molecular, desenvolveram-se técnicas cada vez mais apuradas de se detectar o produto do mecanismo de transcrição gênica: o RNA mensageiro (mRNA). Nos anos noventa surgem as primeiras técnicas de detecção, ainda que semiquantitativa, de mRNA em larga escala (WESTERHOFF; PALSSON, 2004) – os ditos microarranjos de expressão gênica, com crescente utilização a partir dos anos dois mil. A evolução desta ferramenta permitiu acessar de uma só vez, a expressão de grande parte dos genes conhecidos em humanos. Fornecendo um “panorama” transcricional do tecido (ou célula) analisado.

Os microarranjos consistem em “microchips” contendo uma série de oligonucleotídeos complementares a sequências de cDNA obtidas por meio da transcrição reversa dos RNA mensageiros extraídos da amostra. Estes oligonucleotídeos são marcados com um fluoróforo que emite fluorescência quando ligado à sequência complementar. A detecção de um determinado gene é dada pela relação de valores de fluorescência de uma série de sequências (ditas sondas), desenhadas para ligar em sequências específicas à este gene (sondas “*perfect match*”) e sondas ligeiramente diferentes destas, desenhadas para não ligar à sequência do gene (sonda “*mismatch*”). Fabricantes como *Agilent* e *Affymetrix* possuem uma série de plataformas de microarranjos contemplando genes de diferentes espécies. Plataformas como a *U133a Plus 2* da *Affymetrix* são capazes de analisar, em um chip de 2,5cm x 2,5cm mais de 57000 sondas para avaliar a expressão gênica de mais de 17000 genes de *Homo sapiens*.

Biologia de Sistemas

A grande quantidade de informação gerada pelos microarranjos se depara com a perspectiva reducionista, que costuma atribuir o funcionamento de um sistema às propriedades de suas partes – o que inicialmente continuou permeando as perguntas e abordagens à esta técnica – buscando genes “atores” em processos como a progressão tumoral, entretanto, com a incorporação das metodologias de estudos de sistemas complexos, surge uma “nova” disciplina, intitulada “Biologia de Sistemas (Complexos)”, que visa abordagens integrativas no estudo de fenômenos biológicos, utilizando ferramentas computacionais capazes de analisar imensas quantidades de dados, incompatíveis à era pré-computacional.

Os diagramas de interação moleculares constituem uma maneira integrativa de se analisar um determinado processo biológico a nível molecular (BARABASI *et al*, 2004). Estes diagramas, também denominados redes gênicas ou proteicas, representam o conjunto das interações moleculares, seja ele relativo a um determinado processo celular (*e.g.* Inflamassoma – conjunto de genes/proteínas relacionados com a resposta inflamatória) ou a todo repertório de genes/proteínas do organismo, então denominado interatoma.

Com o advento da biologia de sistemas, foram sendo desenvolvidas abordagens integrativas capazes de analisar informações complexas como é o caso das análises de expressão gênica em larga escala (por microarranjos), podendo retirar informações em diferentes níveis, contemplando desde o perfil “global” da transcrição gênica da célula (Transcriptograma - RYBARCZYK-FILHO *et al.*, 2011), até alterações em grupos de genes relativos a determinados processos biológicos (GSEA - SUBRAMANIAN *et al.*, 2005; Transcriptoma de redes - ViaComplex® CASTRO *et al.*, 2009).

Justificativa

O processo de transformação de uma célula requer uma série de etapas que não ocorrem necessariamente em uma sequência temporal, mas seguindo um padrão *microevolutivo* onde um mesmo fenótipo (e.g. evasão da apoptose) pode resultar de disfunções em diferentes vias de sinalização (e.g. TP53 ou PI3K/AKT), selecionadas ao longo do processo de progressão tumoral. Gliomas são tumores bastante agressivos. Sua localização cefálica dificulta (ou até impossibilita, em alguns casos) a excisão cirúrgica, que, dentre as estratégias antitumorais, ainda é a que tem apresentado resultados mais efetivos. A resistência ao tratamento quimioterápico, apresentada por uma boa parte dos tumores gliais, somada à dificuldade na excisão completa do tumor, repercute quase que invariavelmente em um prognóstico ruim. O frequente insucesso dos tratamentos quimioterápicos pode estar atrelado à carência de um direcionamento terapêutico orientado por diagnóstico molecular, e este direcionamento depende de uma melhor compreensão das alterações funcionais ocorridas nas células neste contexto.

OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

Este trabalho visa identificar, com o uso de ferramentas da biologia de sistemas, as assinaturas transcricionais de tumores da glia, buscando relacionar as alterações metabólicas relativas a grupos de pacientes agrupados por similaridades transcricionais, avaliando a representatividade de rotas ou processos biológicos relacionados com a aquisição das “capacidades biológicas tumorais” em cada um destes grupos.

Objetivos Específicos:

- Identificar assinaturas transcricionais relacionadas com os diferentes grupos de pacientes;
- Identificar o diagrama de interação de genes diferencialmente expressos em cada um dos grupos de pacientes, elencando os processos biológicos em que esta rede atua.
- Avaliar a representatividade de rotas ou processos biológicos relacionados com a aquisição das “capacidades biológicas tumorais” em cada um dos grupos;
- Avaliar o panorama transcricional sobre as redes proteicas de alguns dos processos biológicos supracitados.

METODOLOGIA

Coleta de dados de expressão gênica:

O conjunto de microarranjos de expressão gênica de biópsias de tumores gliais foi obtido do repositório de dados de expressão gênica GEO “*Genome Expression Omnibus*”, buscando-se o termo “Glioma”. Sendo o conjunto selecionado agrupado sob o termo “GSE16011” – amostras do Arquivo de Tumores do Centro Médico da Universidade de Erasmus, obtidas entre 1989 e 2005 (GRAVENDEEL et al., 2009). Selecionou-se o GSE16011 pelas seguintes razões: 1º - é o mais representativo grupo de amostras de glioma deste banco de dados, contendo ao todo 276 microarranjos de biópsias de Gliomas de diferentes classificações histopatológicas; 2º - Contém um número considerável de amostras (8) de referência de tecido glial (saudável); 3º - O trabalho “*Intrinsic Gene Expression Profiles of Gliomas Are a Better Predictor of Survival than Histology*” (publicado no periódico “*Cancer Research*” no ano de 2009, por Gravendeel et. al.) que gerou estes dados demonstrou que agrupamento destas amostras por meio do perfil de expressão gênica tem uma melhor capacidade preditiva do prognóstico em relação às análises histopatológicas. 4º - Os resultados obtidos pelos autores foram validados em 5 outros conjuntos de amostras.

Foram retirados do conjunto de amostras, aquelas que na análise do artigo original, acabaram por agrupar com as amostras controle, o que se deve, muito provavelmente a “contaminação” com tecido sadio na amostra; bem como as amostras de tumores recorrentes, restringindo a análise a 254 biópsias tumorais frente às 8 amostras controles. Os dados brutos destes microarranjos (Affymetrix HU133Plus 2.0) foram normalizados pelo método “RMA” com auxílio do pacote “*Affy*” (GAUTIER et. al., 2004) do ambiente estatístico R.

Análise de agrupamento:

O agrupamento das amostras foi feito seguindo o procedimento do artigo de Gravendeel & colaboradores.: onde, dentre os 17527 genes avaliados pelas mais de 57000 sondas dos “arrays” (microarranjos) *Affymetrix HU133Plus 2.0*, foram selecionados os 5000 genes com maior coeficiente de variação os quais orientaram o agrupamento computado pelo algoritmo *HOPACH* (sigla em inglês para particionamento hierárquico ordenado e junção de híbridos - “*hierarchical ordered partitioning and collapsing hybrid*” – (LAAN; POLLARD, 2003), também disponível como um pacote para o ambiente estatístico “R”.

Assinatura transcricional – “Transcriptograma” :

O transcriptograma é uma potente ferramenta de avaliação da transcrição gênica de amostras biológicas por microarranjos. Ele fornece um representativo do perfil global da expressão gênica, plotando valores de expressão gênica relativa sobre um ordenamento funcional de proteínas. Esta metodologia assume para os genes, as propriedades de interação de proteínas codificadas pelos mesmos, e os dispõe linearmente, de maneira que a distância entre dois genes é diretamente proporcional a probabilidade de existência de relação funcional entre eles (RYBARCZYK-FILHO et al., 2011). O ordenamento é obtido através de uma função de custo mínimo que reorganiza a disposição linear (ainda que o mesmo seja “circularizado” para diminuição do “efeito de borda”) das proteínas a cada vez que esta reorganização reduza o “custo” da função, que é dado pela distância entre genes que interagem entre si. Uma outra propriedade atribuída a este ordenamento foi a modularidade, onde observa-se, para uma determinada “janela” (intervalo contínuo de genes) do ordenamento, qual a fração de conexões compartilhadas entre os genes do intervalo.

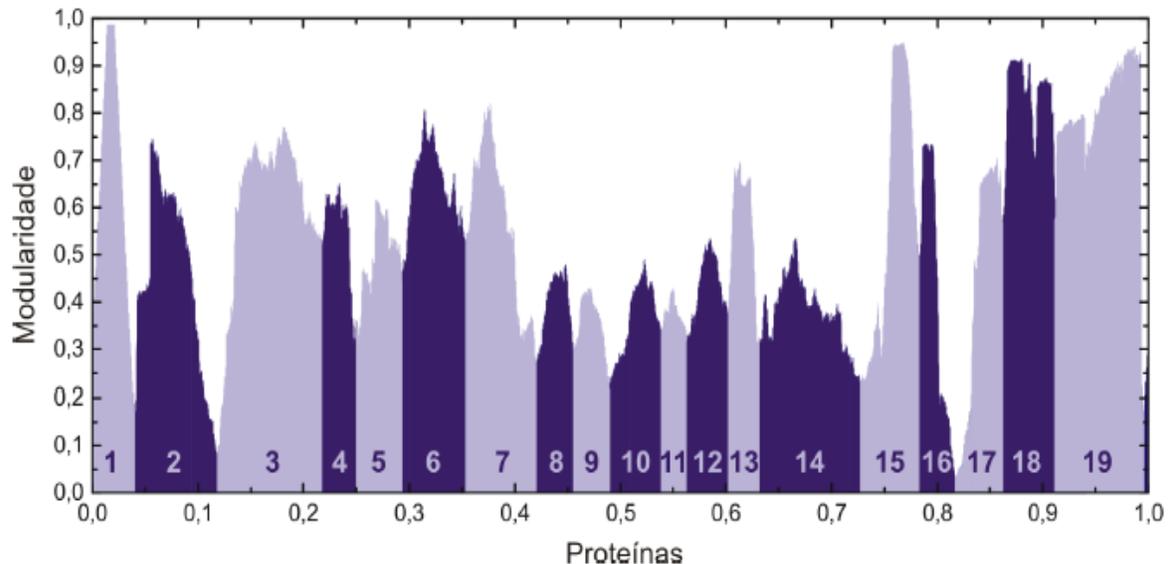


Figura 1: Distribuição dos valores de modularidade e distinção dos módulos do ordenamento de proteínas de *Homo sapiens* para uma janela de 251 genes. Retirado de “*Homo sapiens: Análise de Expressão Gênica por Transcriptograma*” – Monografia de Fernanda Pereira Cruz Benetti.

O sentido biológico deste ordenamento é ressaltado ao sobrepor a informação da modularidade de janela com a distribuição de genes relacionados a processos biológicos sobre o mesmo, onde pode-se observar uma relação entre as áreas de maior modularidade e a concentração de genes relativos a um determinado processo biológico (**Fig. 1**). Ao longo do ordenamento, para uma janela de 251 genes, foram identificados 19 módulos, dos quais 10 foram associados a processos biológicos (**Tabela 1**) (BENETTI, 2010).

Módulo	Processo Biológico	Termo GO:	%
1	Percepção Sensorial	GO:0007606	47,04
3	Metabolismo de Ácidos Orgânicos	GO:0006082	31,96
6	Ciclo Celular	GO:0022402	32,17
7	Processamento de RNA	GO:0006396	21,22
8	Regulação negativa da expressão gênica	GO:0010629	26,60
9	Rotas de Sinalização de Receptores Serina/Treonina Cinase	GO:0007178	20,16
10	Apoptose	GO:0006915	27,03
12	Adesão Celular	GO:0007155	28,70
13	Transdução de Sinal por pequenas GTPases	GO:0007264	20,18
15	Tradução	GO:0006412	26,97

Tabela 1: Processos biológicos predominantes em 10 dos 19 módulos do ordenamento de proteínas de *Homo sapiens* para uma janela de 251 genes. o “Termo GO” refere-se à referência do processo biológico no banco de dados de ontologia “*Gene Ontology*” e o percentual (%) refere-se a razão entre o número de genes do referido processo biológico presentes no módulo e o número do módulo. Adaptado de “*Homo sapiens: Análise de Expressão Gênica por Transcriptograma*” – Monografia de Fernanda Pereira Cruz Benetti.

Avaliou-se por meio desta técnica, a assinatura transcricional de cada um dos grupos de pacientes definidos pelo perfil molecular, no entanto, parametrizando a janela para 101 genes (50 para cada lado de um gene central). Este valor de janela foi escolhido em razão da maior definição da assinatura, uma vez que a expressão gênica é plotada sobre um gene central considerando a média de seus vizinhos. Ainda que seja um valor de janela diferente do utilizado na identificação dos módulos, esta alteração não possui um efeito pronunciado sobre a definição dos módulos biológicos (BENETTI, 2010). Os valores de expressão gênica são relativizados (por meio da razão) ao controle. Definiu-se no

gráfico uma área de dois desvios padrão do controle com o propósito de se verificar módulos cujos desvios sejam significativos.

Análise de expressão diferencial:

A análise de expressão diferencial consiste na identificação dos genes diferencialmente expressos entre fenótipos. Neste caso, a análise comparou os grupos definidos pelo perfil de expressão gênica. Com auxílio do pacote “*limma*” (SMYTH, 2005) para o ambiente estatístico R, foram elencados os genes diferencialmente expressos, relativos a cada fenótipo, para um valor $p < 10^{-5}$. Remontou-se o diagrama de interação dos genes relativos a cada fenótipo com auxílio do pacote “*RedeR*” (CASTRO MAA et. al. 2012), com base na informação do interatoma humano, disponibilizada pelo pacote. Para cada grupo de pacientes, os grafos de genes superexpressos e subexpressos foram analisados em separado quanto aos processos biológicos presentes nestas redes (análise de enriquecimento funcional).

Análise de Enriquecimento de Grupos de Genes:

O GSEA – Sigla em inglês para análise de enriquecimento de grupos de genes – *Gene set Enrichment Analysis* (SUBRAMANIAN et al., 2005) – verifica, dentre um pacote de grupos de genes (GS’s) fornecidos *a priori*, quais mantêm um padrão de distribuição (**fig. 2**) de genes estatisticamente relacionado com dois estados biológicos – neste caso, cada um dos grupos de pacientes de glioma vs. amostras saudáveis. Consiste na análise de distribuição dos componentes de um grupo de genes ao longo de uma lista de genes, ordenadas quanto à sua correlação com o fenótipo.

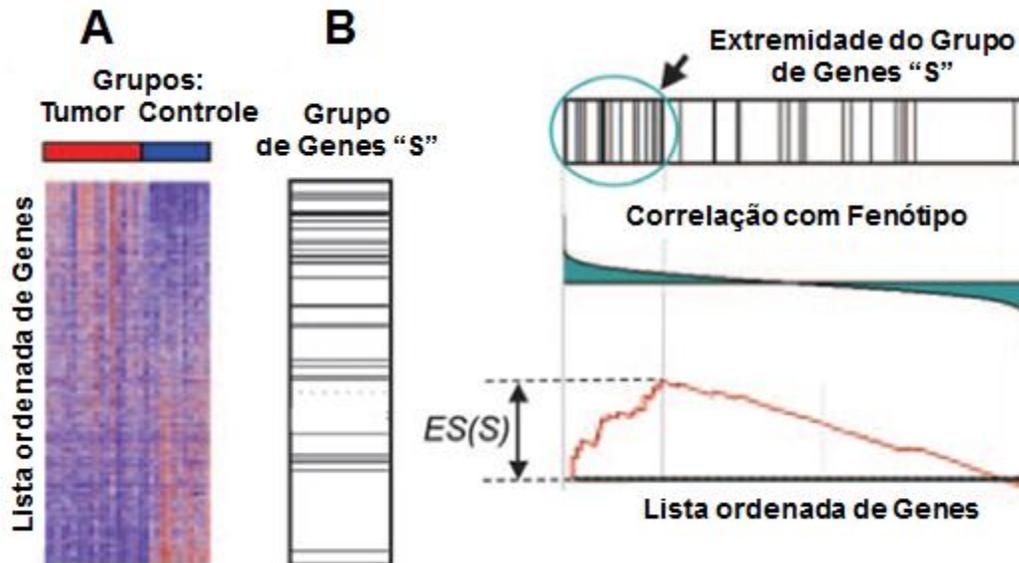


Figura 2: Representativo do método do GSEA: Os dados de expressão são ordenados pelo seu grau de correlação com o grupo biológico analisado (A) então é computada uma somatória que percorre esta lista, que incrementa o valor de enriquecimento a cada vez que a posição analisada corresponder a um gene do grupo de genes – fornecido *a priori* - “S”, e decrementa em caso contrário. O Índice de enriquecimento (ES) de um GS “S” é dado pelo maior valor atingido por esta soma (adaptado de Subramanian et al., 2005)

O conjunto de grupos de genes (GSs) foi obtido do Banco de Dados de Assinaturas Moleculares – MsigDb v.3.1 (*Molecular Signature Database*) selecionando as coleções de grupos de genes “curados” (C2), “alvos de fatores de transcrição” (C3-TFT) e “GO – *Gene Ontology*” (C5), que contivessem menos de 500 genes, totalizando 5194 gene sets. As análises foram feitas pelo software *GSEA-P v.2.07*.

Análise de Enriquecimento Funcional:

As redes diferencialmente expressas de cada grupo foram subdivididas em subredes dos genes subexpressos e superexpressos e importadas para o software *Cytoscape* onde cada uma destas redes foram verificadas quanto a processos biológicos nos quais os seus componentes atuam, por meio do plugin BiNGO – “*Biological Network Gene Ontology*” (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005) – Ontologia dos Genes (GO) de Redes Biológicas.

Panorama transcricional de redes funcionais

Foram selecionados 5 diagramas de interação para serem avaliados quanto a seu perfil de alteração em cada um dos grupos de pacientes.

1. Rede Apoptose e Estabilidade Genômica (CASTRO et al., 2008)

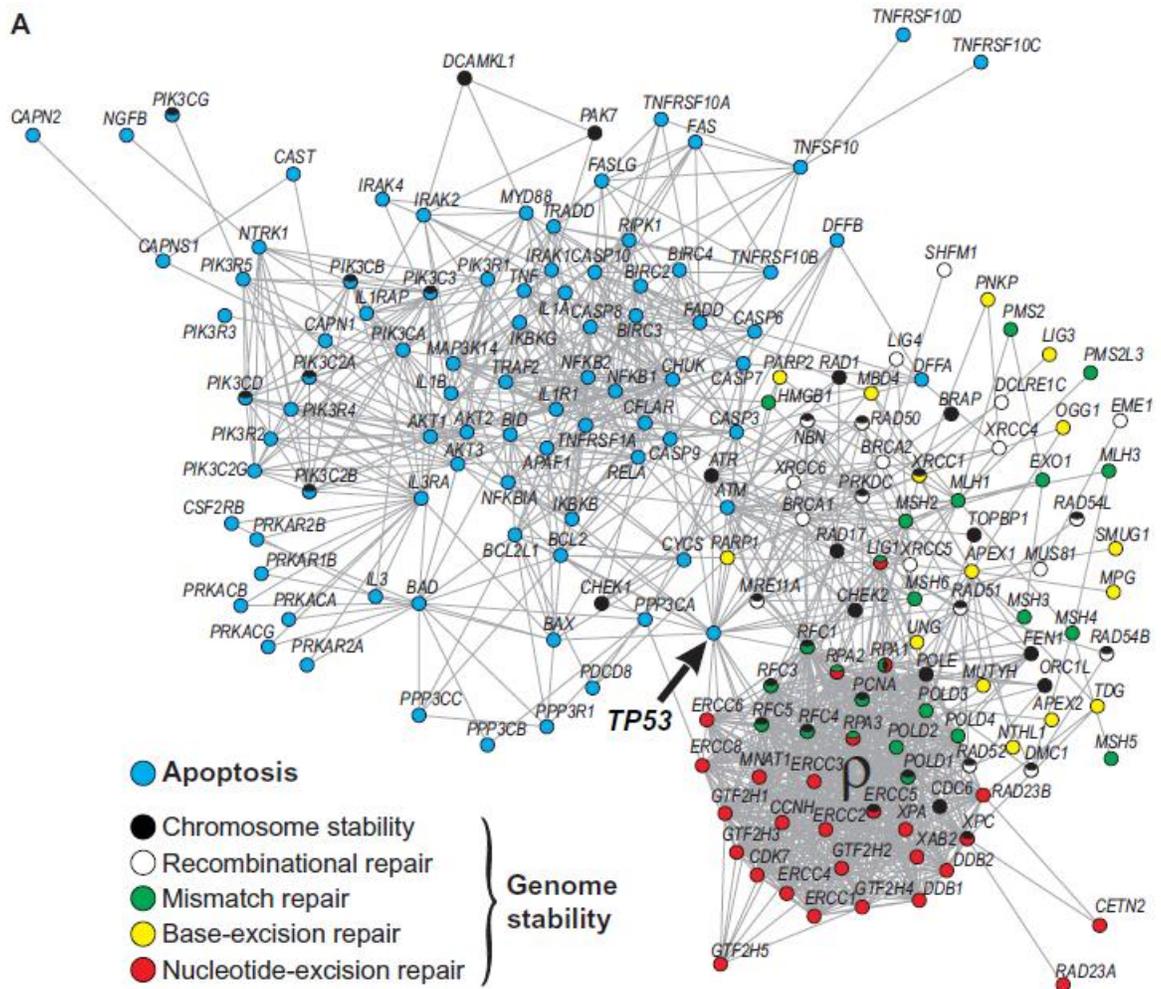


Figura 3: Diagrama de interação referente aos processos de apoptose e estabilidade genômica (CASTRO et al., 2008).

4. Diagrama de interação dos genes do metabolismo energético (DALMOLIN et al., 2011).

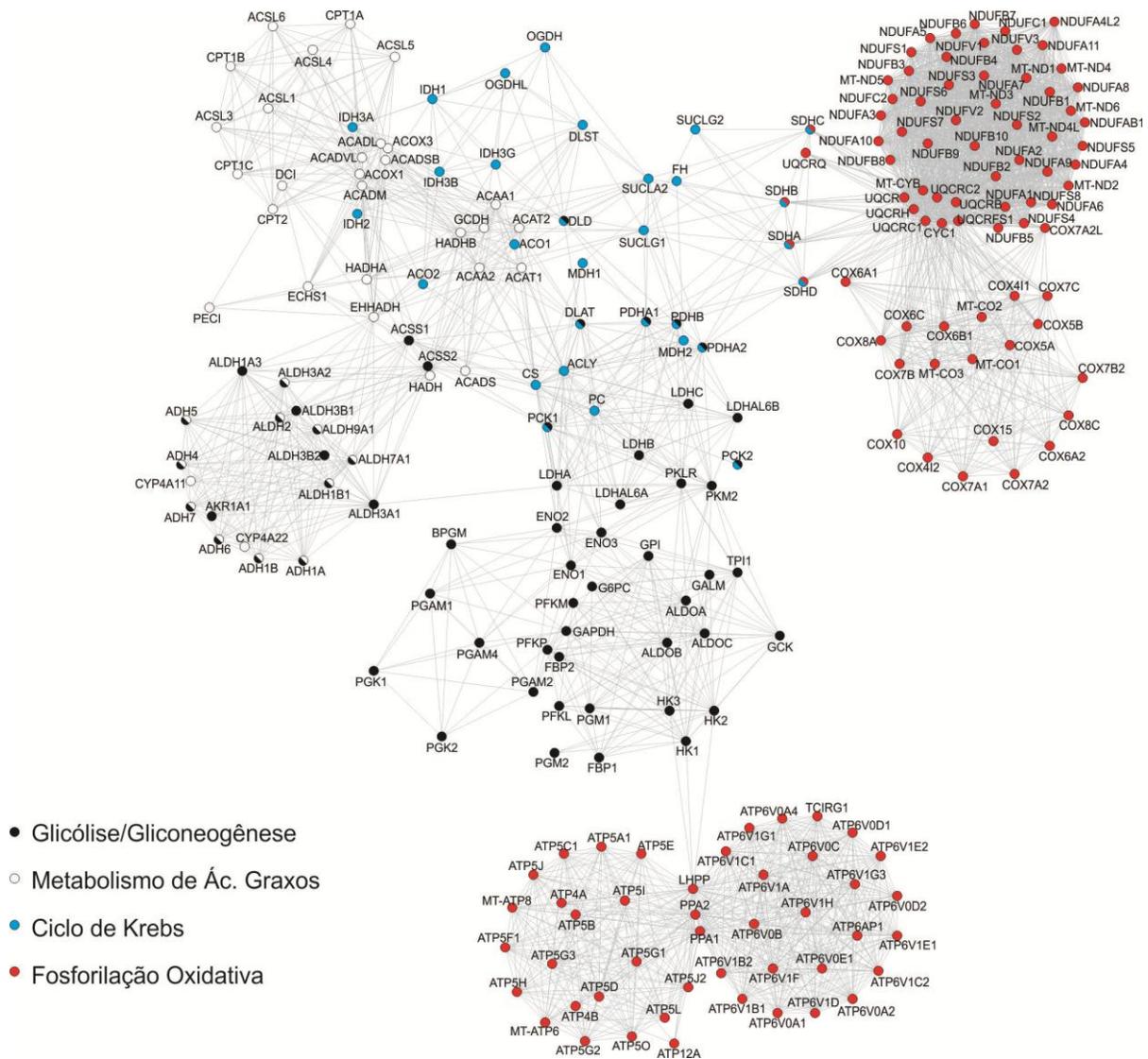


Figura 6: Diagrama de interação dos genes do metabolismo energético (adap de DALMOLIN et al., 2011).

5. Diagrama de interação de genes relacionados com sobrevivência, metabolismo Glicolítico, resposta a estresse (Oxidativo) e o fator NFKB.

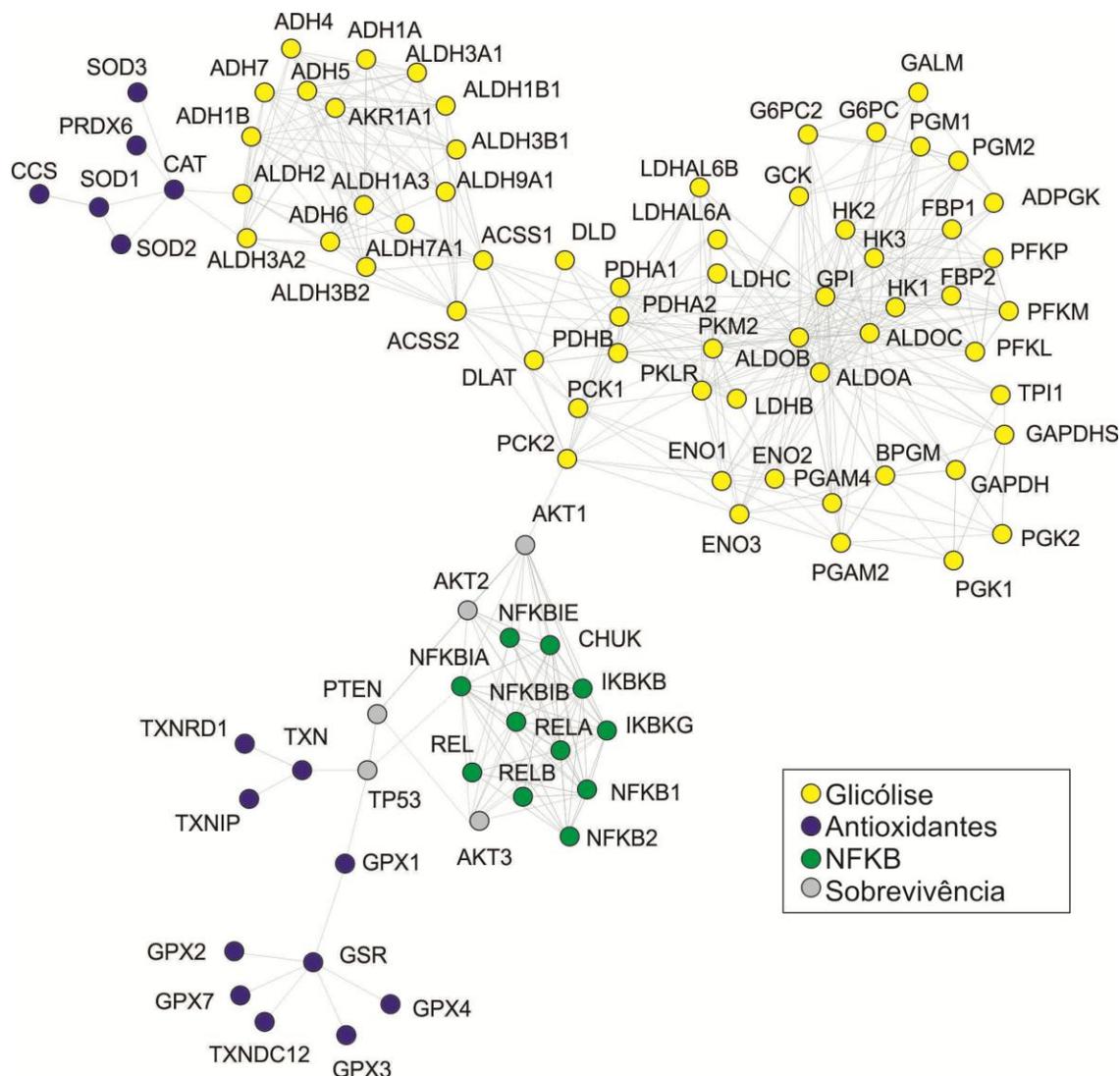


Figura 8: Diagrama de interação dos genes relacionados com a sobrevivência de tumores, defesas antioxidantes, Glicólise e subunidades do Fator Nuclear de Transcrição Kappa B (NFkB).

O panorama transcricional das redes acima foi computado por meio do software ViaComplex® (CASTRO *et al.*, 2009), utilizando-se dos valores médios de cada um dos grupos *vs.* a média dos controles. Esta ferramenta permite utilizar-se da rede de genes como pano de fundo para avaliar o espalhamento transcricional (o efeito sobre a rede, na alteração transcricional), aplicando uma 3ª dimensão (de cor) sobre as 2 dimensões dadas pelas redes.

RESULTADOS

A análise de agrupamento definiu 6 classes de pacientes:

A análise de agrupamento por perfil molecular dos 254 pacientes demonstrou-se bastante coerente com o resultado de Gravendeel (2009), com apenas 5 pacientes sendo alocados em grupos diferentes dos propostos (**Fig 9**). Devido a esta coerência, os dados de agrupamento utilizados para as análises seguintes compreendem as 6 classes de tumores, que foram referenciadas da mesma forma que no artigo de Gravendeel, pois mantiveram características bastante similares.

Grupo de Pacientes	CL9	CL16	CL17	CL18	CL22	CL23
Idade Mediana	46.735	33.88	36.66	57.7	41.51	56.42
Sobrevida Mediana	5.095	N/D	2.885	0.66	1.12	0.65

Tabela 2: Informações clínicas de cada uma das classes (CL's): Idade Mediana e sobrevida mediana (ambas em anos).

Tumores de um mesmo grupo histopatológico apresentam perfis moleculares diferentes. O agrupamento por perfis moleculares foi capaz de definir classes com maior capacidade preditiva de sobrevida do que análises histopatológicas. Tumores de uma mesma histologia agrupam em classes diferentes (**Fig 9**).

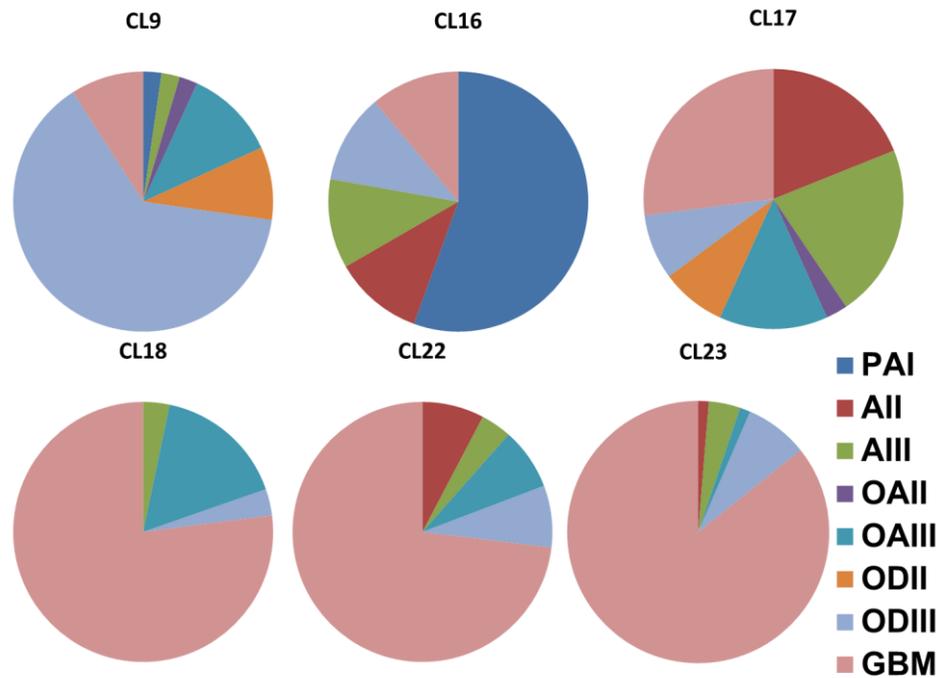


Figura 9: Composição de cada um dos grupos definidos pela análise, quanto aos tipos histológicos de tumor: A = Astrocitoma, PA = Astrocitoma Pilocítico, OD = Oligodendroglioma, AO = Oligoastrocitoma, GBM = Glioblastoma (Astrocitoma Grau IV), sendo os algarismos romanos que seguem, a referência do grau destes tumores.

A Assinatura Transcricional é Diferente em Cada uma das Classes:

Cada uma das classes apresenta um perfil de transcrição gênica, onde as mais agressivas são as que mais se distanciam do controle. A intensidade dos picos é diferente em cada classe, ainda que seu desenho conserve um “padrão”.

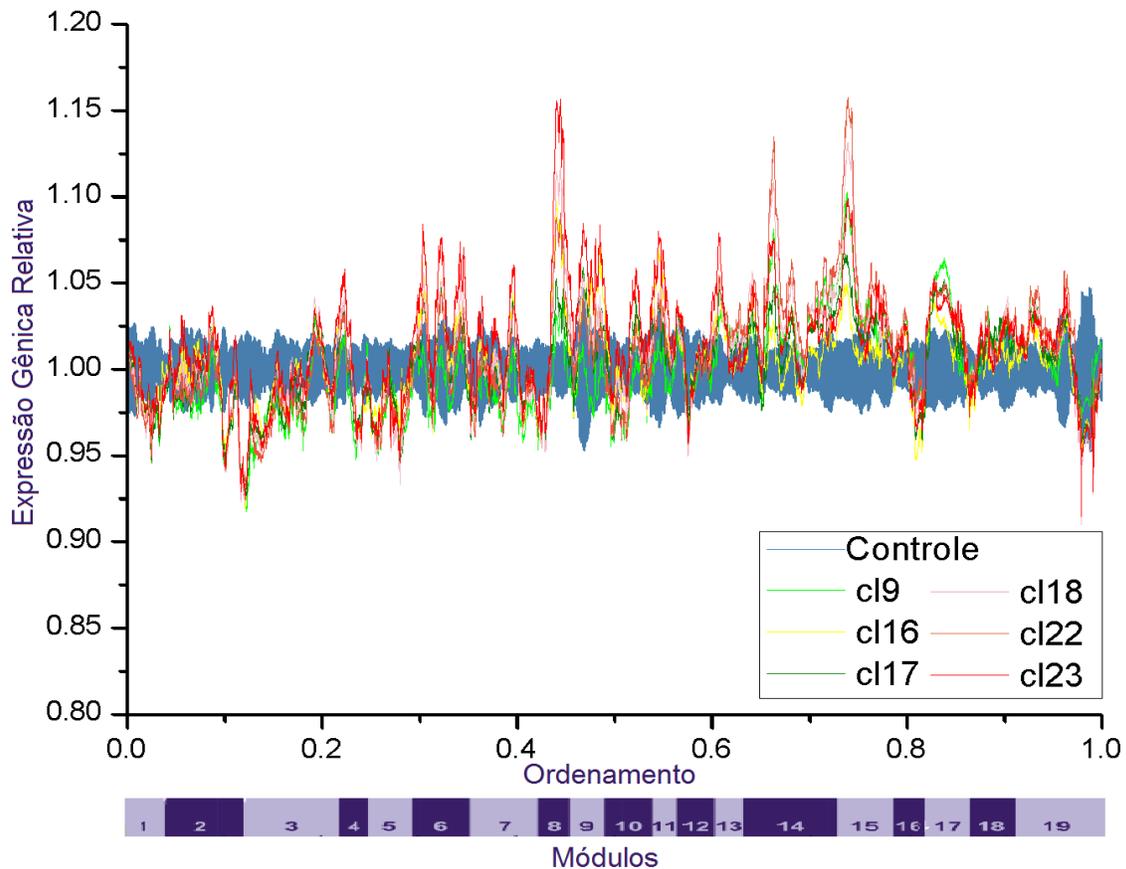


Figura 10: Sobreposição dos Transcriptogramas de todas as classes analisadas (relativizadas ao controle) onde a faixa central azul corresponde ao intervalo de dois desvios padrão acima e abaixo do controle. Abaixo, enumeração dos módulos.

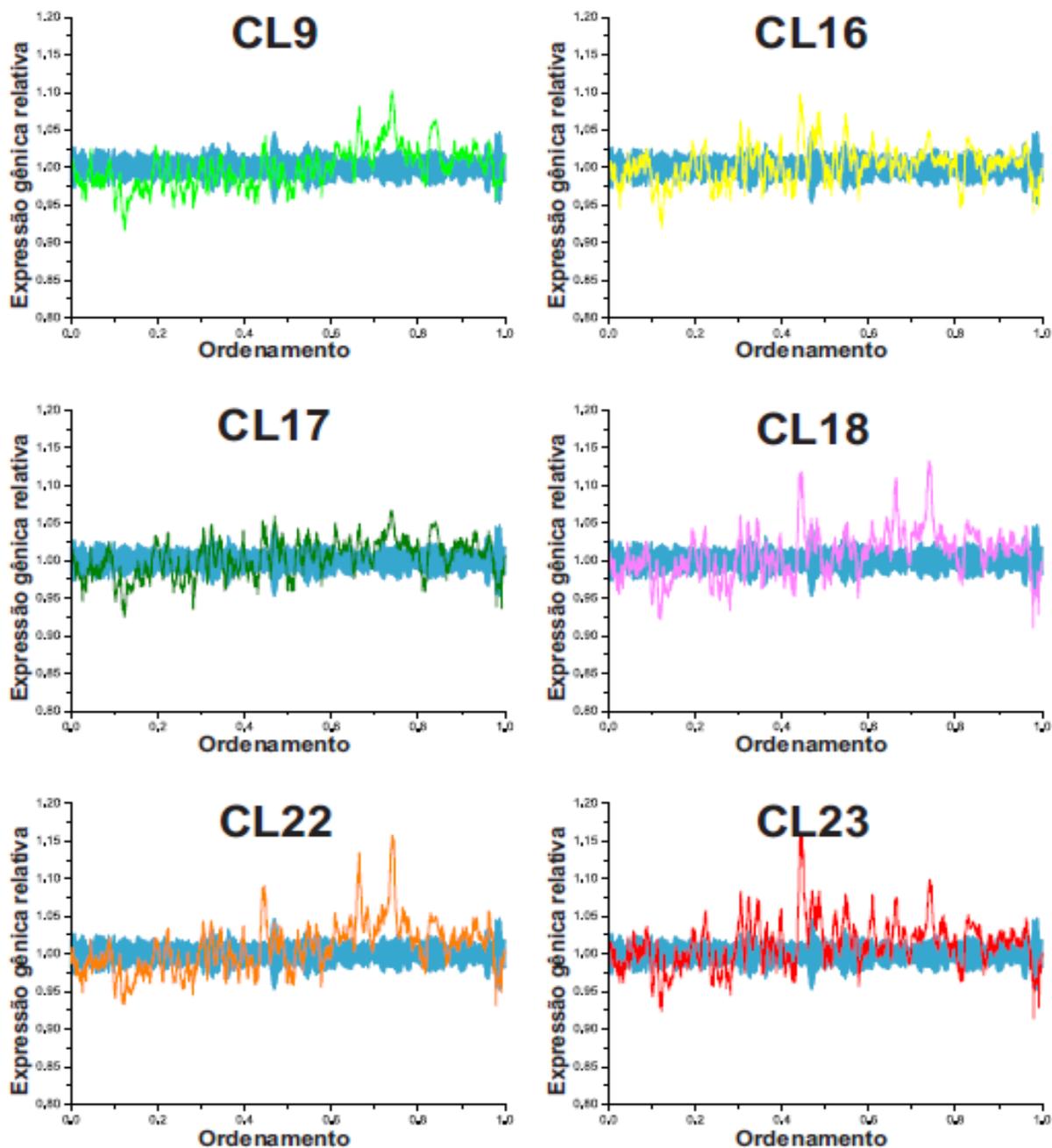


Figura 11: Transcriptogramas individualizado para cada um dos grupos. Em azul, a faixa correspondente a 2 desvios padrão acima e abaixo da média do controle (valor central). Verifica-se que os grupos de menor sobrevivência *i.e.* CL18, CL22 e CL23 possuem picos nos valores de expressão gênica que se afastam consideravelmente do controle.

Os Grupos Diferem Quanto ao Número de Grupos de Genes (GSs) Enriquecidos e à Intensidade do Enriquecimento.

O número grupos de genes alterados em cada um dos grupos é diferente, aparentemente estando relacionado com a agressividade de tumores – observe que as classes mais agressivas (CL18 e CL23) são as que tem um maior número de GS alterados (**Fig. 12 e Tabelas 3 a 8**).

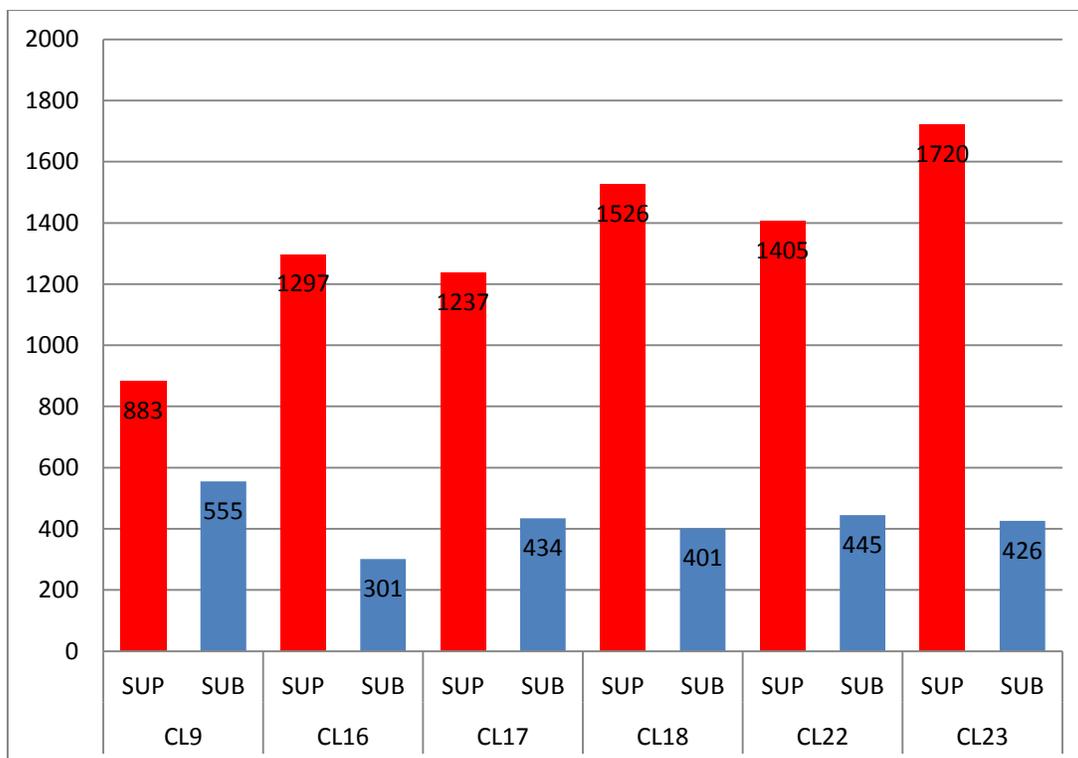


Figura 12: Número de GS enriquecidos em cada um dos grupos, com relação ao grupo controle (Valor $P < 0,001$), em vermelho, os GS cuja atividade transcricional encontra-se mais elevada nos tumores, com relação ao controle, e em azul, os mais expressos no tecido não alterado – subexpressos nos tumores.

Os GS identificados nos grupos apontam alterações transcricionais em processos biológicos vitais, como ciclo celular, inflamação, síntese proteica, reparo e metabolismo de DNA. E a intensidade de alteração de GS relacionados com as capacidades biológicas tumorais é diferente em cada um dos grupos.

CL9

Referência MSigDb	N	ES
REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	78	0.587
REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	78	0.587
CROONQUIST_NRAS_SIGNALING_DN	60	0.573
PUJANA_BRCA2_PCC_NETWORK	389	0.403
DANG_MYC_TARGETS_UP	116	0.376
RNA_PROCESSING	146	0.371
MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_DN	192	0.326
REACTOME_GENE_EXPRESSION	358	0.321
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	277	0.314
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	277	0.314
NEUROLOGICAL_SYSTEM_PROCESS	359	-0.226
TRANSMISSION_OF_NERVE_IMPULSE	181	-0.32
MCCLUNG_CREB1_TARGETS_UP	85	-0.387
REACTOME_ACTIVATION_OF_NMDA_RECEPTOR_UPON_GLUTAMATE_BINDING_AND_POSTSYNAPTIC_EVENTS	36	-0.557
BIOCARTA_CACAM_PATHWAY	13	-0.74

Tabela 3: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL9, em na primeira coluna, o nome de referência do GS no MSigDb, na segunda, o número de genes que compõe o GS, e na terceira, em azul, os valores de ES dos GS subexpressos pelo tumor e, em vermelho, os superexpressos.

CL16

Referência MSigDb	N	ES
AGARWAL_AKT_PATHWAY_TARGETS	6	0.685
SA_FAS_SIGNALING	6	0.617
ST_INTERLEUKIN_13_PATHWAY	7	0.609
NAKAYAMA_SOFT_TISSUE_TUMORS_PCA1_UP	79	0.606
LAU_APOPTOSIS_CDKN2A_DN	5	0.594
SA_MMP_CYTOKINE_CONNECTION	14	0.593
TSUNODA_CISPLATIN_RESISTANCE_UP	9	0.68
BIOCARTA_LYM_PATHWAY	11	0.62
BIOCARTA_GABA_PATHWAY	10	-0.575
NEUROTRANSMITTER_SECRETION	11	-0.623
REACTOME_NOREPINEPHRINE_NEUROTRANSMITTER_RELEASE_CYCLE	12	-0.627
METABOTROPIC_GLUTAMATEGABA_B_LIKE_RECEPTOR_ACTIVITY	10	-0.631
BIOCARTA_CACAM_PATHWAY	13	-0.657
REACTOME_RAS_ACTIVATION_UOPN_CA2_INFUX_THROUGH_NMDA_RECEPTOR	18	-0.666
REACTOME_ACETYLCHOLINE_NEUROTRANSMITTER_RELEASE_CYCLE	11	-0.687

Tabela 4: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL16, em na primeira coluna, o nome de referência do GS no MSigDb, na segunda, o número de genes que compõe o GS, e na terceira, em azul, os valores de ES dos GS subexpressos pelo tumor e, em vermelho, os superexpressos.

CL17

Referência MSigDb	N	ES
LIANG_SILENCED_BY_METHYLATION_DN	10	0.75
REICHERT_G1S_REGULATORS_AS_PI3K_TARGETS	8	0.674
BIOCARTA_ATM_PATHWAY	20	0.66
BIOCARTA_LYM_PATHWAY	11	0.66
TCGA_GLIOMASTOMA_MUTATED	8	0.638
ST_IL_13_PATHWAY	7	0.595
BIOCARTA_NFKB_PATHWAY	22	0.583
SA_MMP_CYTOKINE_CONNECTION	14	0.577
MOSERLE_IFNA_RESPONSE	27	0.576
BIOCARTA_MONOCYTE_PATHWAY	11	0.57
BIOCARTA_RELA_PATHWAY	16	0.558
PUJANA_XPRSS_INT_NETWORK	155	0.396
PUJANA_BRCA_CENTERED_NETWORK	92	0.396
WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE	302	0.301
BIOCARTA_CACAM_PATHWAY	13	-0.605
SYNAPTIC_TRANSMISSION	166	-0.376
REACTOME_NEURORANSITTER_RECEPTOR_BINDING_AND_DOWNSTREA		
M_TRANSMISSION_IN_THE_POSTSYNAPTIC_CELL	82	-0.418
REACTOME_TRANSMISSION_ACROSS_CHEMICAL_SYNAPSES	128	-0.423

Tabela 5: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL17, em na primeira coluna, o nome de referência do GS no MSigDb, na segunda, o número de genes que compõe o GS, e na terceira, em azul, os valores de ES dos GS subexpressos pelo tumor e, em vermelho, os superexpressos.

CL18

Referência MSigDb	N	ES
REACTOME_UNWINDING_OF_DNA	10	0.888
EGUCHI_CELL_CYCLE_RB1_TARGETS	19	0.783
WU_APOPTOSIS_BY_CDKN1A_VIA_TP53	34	0.675
TCGA_GLIOMASTOMA_MUTATED	8	0.639
BIOCARTA_ATM_PATHWAY	20	0.621
BIOCARTA_P53_PATHWAY	16	0.615
OHASHI_AURKB_TARGETS	6	0.609
COLLER_MYC_TARGETS_UP	12	0.601
BIOCARTA_NFKB_PATHWAY	22	0.543
BIOCARTA_CACAM_PATHWAY	13	-0.628
BIOCARTA_GABA_PATHWAY	10	-0.628
GLUTAMATE_RECEPTOR_ACTIVITY	20	-0.651
NEUROTRANSMITTER_SECRETION	11	-0.653
REACTOME_SEROTONIN_NEUROTRANSMITTER_RELEASE_CYCLE	14	-0.737
REACTOME_DOPAMINE_NEUROTRANSMITTER_RELEASE_CYCLE	14	-0.737

Tabela 6: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL18, em na primeira coluna, o nome de referência do GS no MSigDb, na segunda, o número de genes que compõe o GS, e na terceira, em azul, os valores de ES dos GS subexpressos pelo tumor e, em vermelho, os superexpressos.

CL22

Referência MSigDb	N	ES
REICHERT_G1S_REGULATORS_AS_PI3K_TARGETS	8	0.887
WU_APOPTOSIS_BY_CDKN1A_VIA_TP53	34	0.689
REACTOME_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION_REPAIR	15	0.633
REACTOME_EXTENSION_OF_TELOMERES	24	0.628
TCGA_GLIOMASTOMA_MUTATED	8	0.613
BIOCARTA_ATRBRCA_PATHWAY	21	0.557
BIOCARTA_KREB_PATHWAY	8	-0.481
REACTOME_AMINO_ACID_SYNTHESIS_AND_INTERCONVERSION	12	-0.52
BIOCARTA_GABA_PATHWAY	10	-0.637
BIOCARTA_CACAM_PATHWAY	13	-0.651
REACTOME_NOREPINEPHRINE_NEUROTRANSMITTER_RELEASE_CYCLE	12	-0.652
REACTOME_DOPAMINE_NEUROTRANSMITTER_RELEASE_CYCLE	14	-0.738

Tabela 7: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL22, em na primeira coluna, o nome de referência do GS no MSigDb, na segunda, o número de genes que compõe o GS, e na terceira, em azul, os valores de ES dos GS subexpressos pelo tumor e, em vermelho, os superexpressos.

CL23

Referência MSigDb	N	ES
BIERIE_INFLAMMATORY_RESPONSE_TGFB1	5	0.837
BIOCARTA_MONOCYTE_PATHWAY	11	0.717
MOSERLE_IFNA_RESPONSE	27	0.672
SA_MMP_CYTOKINE_CONNECTION	14	0.664
AGARWAL_AKT_PATHWAY_TARGETS	6	0.657
GILMORE_CORE_NFKB_PATHWAY	10	0.645
BIOCARTA_P53_PATHWAY	16	0.632
KONDO_HYPOXIA	5	0.625
TIAN_TNF_SIGNALING_VIA_NFKB	21	0.611
KEGG_MISMATCH_REPAIR	22	0.596
REACTOME_PKA_ACTIVATION	16	-0.42
NEUROTRANSMITTER_SECRETION	11	-0.628
GLUTAMATE_RECEPTOR_ACTIVITY	20	-0.631
BIOCARTA_GABA_PATHWAY	10	-0.633
BIOCARTA_CACAM_PATHWAY	13	-0.634
METABOTROPIC_GlutamateGABA_B_LIKE_RECEPTOR_ACTIVITY	10	-0.73

Tabela 8: Representativo dos GS enriquecidos no grupo CL23, em na primeira coluna, o nome de referência do GS no MSigDb, na segunda, o número de genes que compõe o GS, e na terceira, em azul, os valores de ES dos GS subexpressos pelo tumor e, em vermelho, os superexpressos.

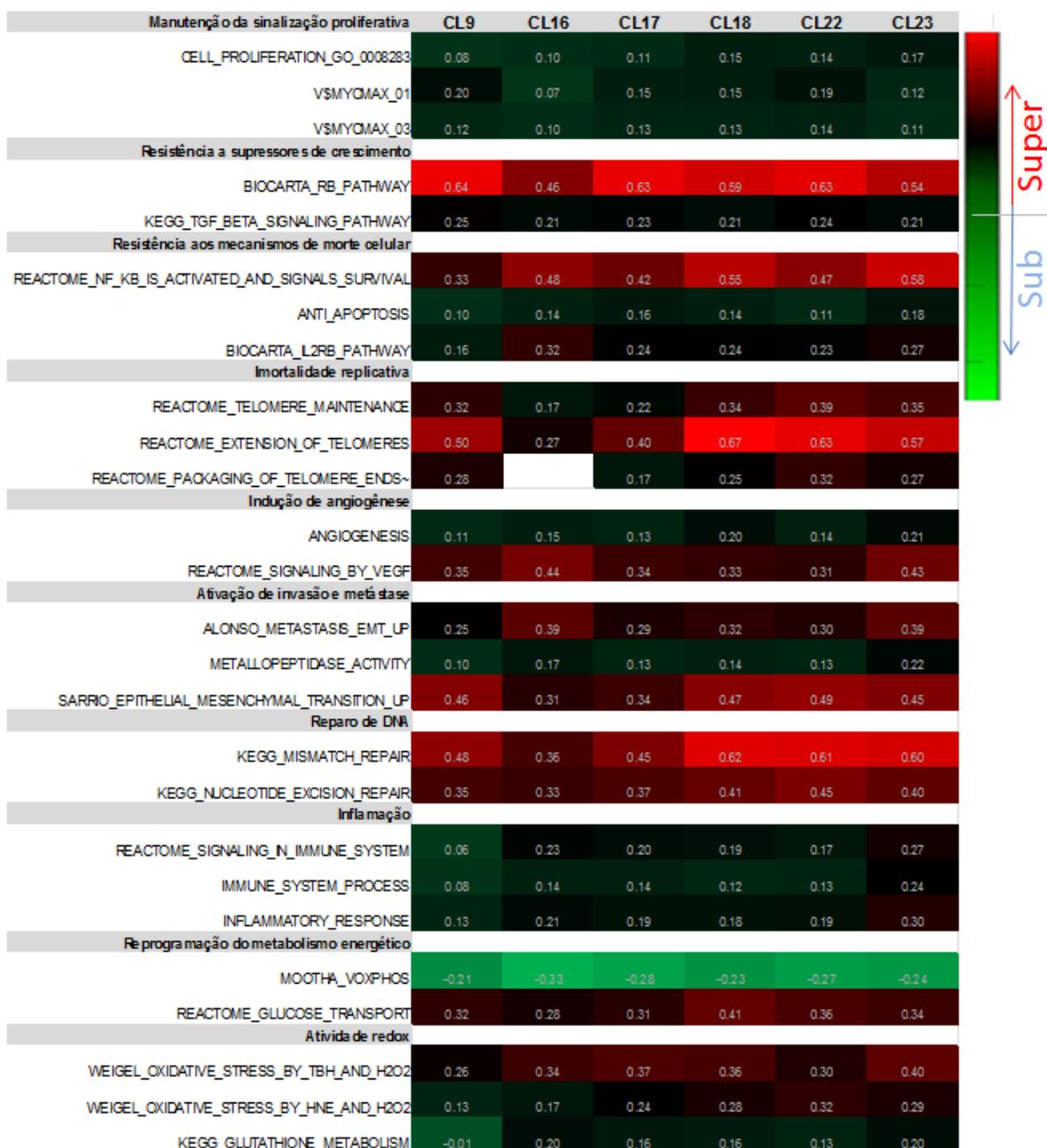


Figura 13: Escala de cor dos valores de enriquecimento de GS relacionados com a aquisição de capacidades biológicas tumorais, em cada um dos grupos de pacientes. A representatividade da escala refere-se ao bloco de valores referentes ao conjunto de GS relativo a cada “Capacidade tumoral” – Em branco, os valores indeterminados (o GS não era distintivo do controle).

As Redes de Genes Diferencialmente Expressos de Cada Grupo Difere Quanto à sua Complexidade:

A complexidade das redes diferencialmente expressas (**fig. 14 a 20**) (dada pelo número de vértices e arestas – genes e relações funcionais) também parece ter relação com as classes previamente estabelecidas, onde os grupos de menor sobrevida são também os que apresentam as redes mais complexas.

Classe	CL9	CL16	CL17	CL18	CL22	CL23
Nº de Genes (vértices)	1108	775	1100	1520	1398	1741
Nº de Relações (arestas)	2268	1630	2397	3713	3230	4219

Tabela 9: Número de vértices e arestas de cada um dos diagramas de interação dos genes superexpressos em cada classe.

Verificou-se também, quais eram os processos biológicos (termos de ontologia do *Gene Ontology*) mais significativamente representados nestas redes (**tabelas 10 a 15**).

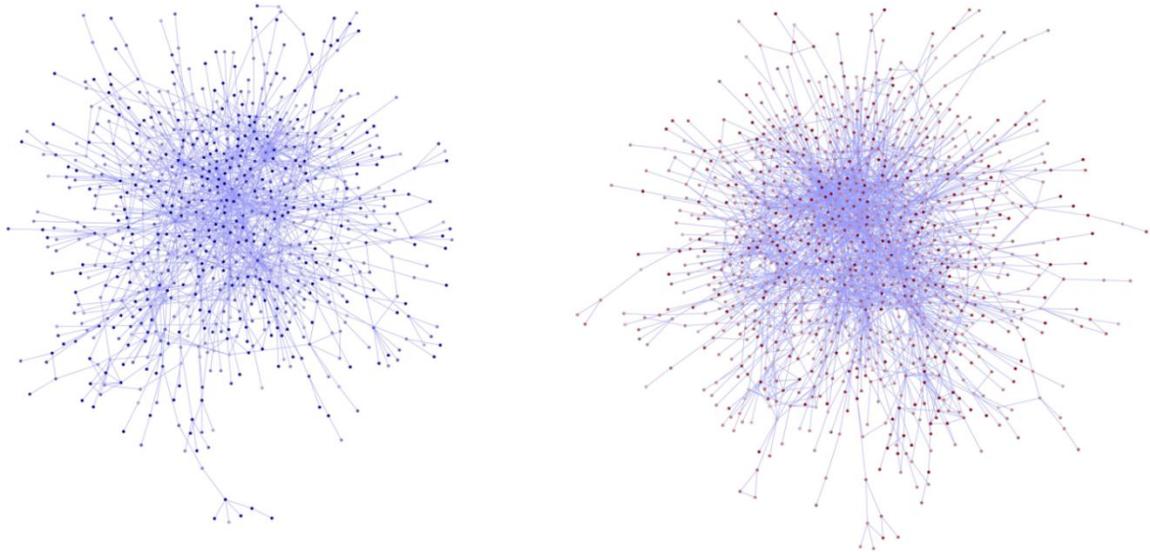


Figura 14: Rede de genes subexpressos (esquerda) e superexpressos (dir) de CL9.

CL9					
Subexpressos			Superexpressos		
GO-ID	Description	p-value	GO-ID	Description	p-value
23052	signaling	4.56E-59	90304	nucleic acid metabolic process	8.81E-98
23060	signal transmission	6.04E-56	44260	cellular macromolecule metabolic process	4.48E-89
23046	signaling process	6.04E-56	6139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1.63E-78
19226	transmission of nerve impulse	2.61E-39	43170	macromolecule metabolic process	1.58E-74
7268	synaptic transmission	2.67E-39	10467	gene expression	1.06E-71
51234	establishment of localization	1.21E-32	16070	RNA metabolic process	1.68E-67
6810	transport	2.05E-31	34641	cellular nitrogen compound metabolic process	6.23E-62
51179	localization	4.37E-31	6807	nitrogen compound metabolic process	1.21E-56
7165	signal transduction	6.10E-31	8380	RNA splicing	9.98E-49
7267	cell-cell signaling	1.96E-30	9059	macromolecule biosynthetic process	7.87E-47
23033	signaling pathway	2.44E-30	6396	RNA processing	3.13E-46
7154	cell communication	5.00E-30	34645	cellular macromolecule biosynthetic process	5.84E-46
7399	nervous system development	1.05E-28	44237	cellular metabolic process	3.12E-41
35556	intracellular signal transduction	5.35E-25	9987	cellular process	1.81E-39
23034	intracellular signaling pathway	1.44E-23	16071	mRNA metabolic process	1.92E-39
65007	biological regulation	5.69E-22	44238	primary metabolic process	5.03E-39
50789	regulation of biological process	5.45E-21	6397	mRNA processing	2.03E-34
16192	vesicle-mediated transport	5.48E-21	60255	regulation of macromolecule metabolic process	3.54E-34
22008	Neurogenesis	6.20E-21	6259	DNA metabolic process	2.21E-33
48699	generation of neurons	8.69E-21	7049	cell cycle	1.38E-31

Tabela 10: 20 termos mais significativos da ontologia das redes de genes diferencialmente expressos em CL9.

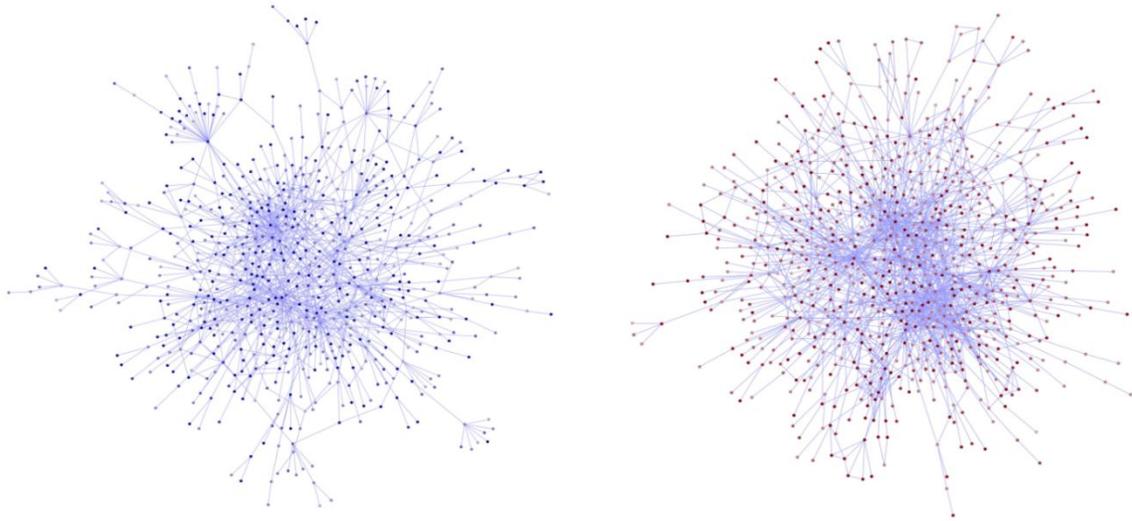


Figura 15: Rede de genes subexpressos (esq.) e superexpressos (dir.) de CL16.

CL16					
Subexpressos			Superexpressos		
GO-ID	Description	p-value	GO-ID	Description	p-value
23052	signaling	1.21E-47	50789	regulation of biological process	1.37E-39
23060	signal transmission	7.77E-43	65007	biological regulation	3.06E-39
23046	signaling process	7.77E-43	48518	positive regulation of biological process	2.59E-37
7268	synaptic transmission	1.76E-39	50794	regulation of cellular process	1.16E-36
19226	transmission of nerve impulse	4.44E-39	48522	positive regulation of cellular process	3.81E-33
7154	cell communication	1.15E-29	48519	negative regulation of biological process	1.10E-31
7267	cell-cell signaling	1.83E-29	23033	signaling pathway	4.51E-30
51234	establishment of localization	1.41E-27	48523	negative regulation of cellular process	3.29E-28
6810	transport	2.83E-26	44260	cellular macromolecule metabolic process	6.72E-27
51179	localization	2.10E-24	23052	signaling	1.91E-26
23033	signaling pathway	5.17E-24	43170	macromolecule metabolic process	7.73E-26
7165	signal transduction	2.38E-20	2376	immune system process	1.18E-25
9987	cellular process	3.89E-19	23034	intracellular signaling pathway	2.99E-25
7399	nervous system development	3.95E-19	7165	signal transduction	3.73E-24
43687	post-translational protein modification	1.41E-18	42127	regulation of cell proliferation	1.23E-22
51649	establishment of localization in cell	1.56E-18	6950	response to stress	3.42E-22
65007	biological regulation	2.88E-18	10941	regulation of cell death	7.73E-22
35556	intracellular signal transduction	3.64E-18	43067	regulation of programmed cell death	1.28E-21
7269	neurotransmitter secretion	4.28E-18	42981	regulation of apoptosis	1.92E-21
3001	generation of a signal involved in cell-cell signaling	5.90E-18	6357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.76E-21

Tabela 11: 20 termos mais significativos da ontologia das redes de genes diferencialmente expressos em CL16.

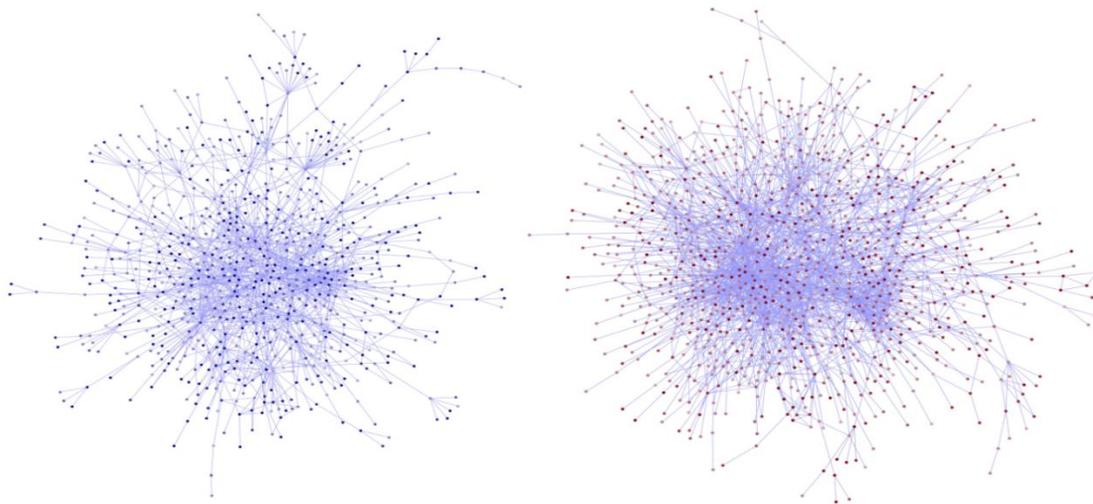


Figura 16: Rede de genes subexpressos (esq.) e superexpressos (dir.) de CL17.

CL17					
Subexpressos			Superexpressos		
GO-ID	Description	p-value	GO-ID	Description	p-value
23052	signaling	6.16E-58	44260	cellular macromolecule metabolic process	5.62E-54
23060	signal transmission	6.54E-50	43170	macromolecule metabolic process	1.00E-47
23046	signaling process	6.54E-50	90304	nucleic acid metabolic process	1.88E-45
19226	transmission of nerve impulse	1.90E-43	10467	gene expression	8.40E-43
7268	synaptic transmission	9.21E-43	50789	regulation of biological process	2.55E-41
7267	cell-cell signaling	8.30E-33	50794	regulation of cellular process	1.23E-39
7154	cell communication	4.50E-32	65007	biological regulation	1.97E-37
51234	establishment of localization	4.33E-31	16070	RNA metabolic process	2.68E-37
51179	localization	2.30E-30	6139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	2.06E-35
6810	transport	6.79E-30	48518	positive regulation of biological process	8.68E-32
23033	signaling pathway	9.26E-30	48522	positive regulation of cellular process	1.66E-31
7165	signal transduction	3.25E-24	8380	RNA splicing	7.08E-31
43687	post-translational protein modification	1.11E-22	60255	regulation of macromolecule metabolic process	2.34E-29
7399	nervous system development	6.66E-22	16071	mRNA metabolic process	9.29E-28
23034	intracellular signaling pathway	8.47E-22	6396	RNA processing	7.97E-27
6796	phosphate metabolic process	2.13E-20	34641	cellular nitrogen compound metabolic process	1.66E-26
6793	phosphorus metabolic process	2.13E-20	19222	regulation of metabolic process	3.98E-26
51641	cellular localization	2.59E-20	80090	regulation of primary metabolic process	8.31E-26
51649	establishment of localization in cell	3.24E-20	10468	regulation of gene expression	3.82E-25
35556	intracellular signal transduction	1.67E-19	9059	macromolecule biosynthetic process	5.13E-25

Tabela 12: 20 termos mais significativos da ontologia das redes de genes diferencialmente expressos em CL17.

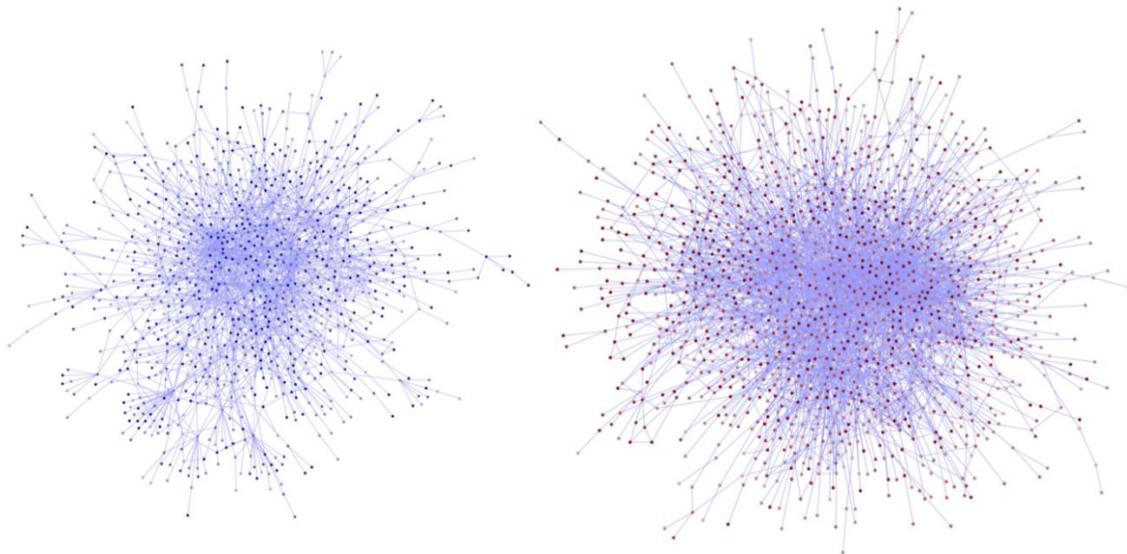


Figura 17: Rede de genes subexpressos (esq.) e superexpressos (dir) de CL18.

CL18					
Subexpressos			Superexpressos		
GO-ID	Description	p-value	GO-ID	Description	p-value
23052	signaling	2.35E-69	44260	cellular macromolecule metabolic process	4.20E-74
23060	signal transmission	1.91E-61	90304	nucleic acid metabolic process	2.36E-67
23046	signaling process	1.91E-61	43170	macromolecule metabolic process	4.24E-65
19226	transmission of nerve impulse	1.14E-49	6139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	9.11E-52
7268	synaptic transmission	1.17E-49	7049	cell cycle	7.76E-51
7267	cell-cell signaling	1.51E-36	9987	cellular process	7.60E-50
7154	cell communication	8.21E-36	22402	cell cycle process	9.34E-47
23033	signaling pathway	1.05E-33	16043	cellular component organization	2.50E-42
51234	establishment of localization	5.19E-33	22403	cell cycle phase	1.83E-40
6810	transport	4.05E-32	8380	RNA splicing	8.55E-40
7165	signal transduction	1.14E-31	10467	gene expression	1.41E-39
51179	localization	3.47E-31	34641	cellular nitrogen compound metabolic process	3.13E-39
65007	biological regulation	1.20E-27	278	mitotic cell cycle	7.02E-39
43687	post-translational protein modification	5.29E-27	50789	regulation of biological process	1.91E-38
7399	nervous system development	2.09E-25	50794	regulation of cellular process	3.13E-37
50789	regulation of biological process	6.50E-25	48518	positive regulation of biological process	1.18E-36
6796	phosphate metabolic process	5.73E-24	16070	RNA metabolic process	2.76E-36
6793	phosphorus metabolic process	5.73E-24	65007	biological regulation	4.12E-36
23034	intracellular signaling pathway	6.17E-24	48522	positive regulation of cellular process	5.27E-36
35556	intracellular signal transduction	9.22E-24	6807	cellular process nitrogen compound metabolic process	1.21E-34

Tabela 13: 20 termos mais significativos da ontologia das redes de genes diferencialmente expressos em CL18.

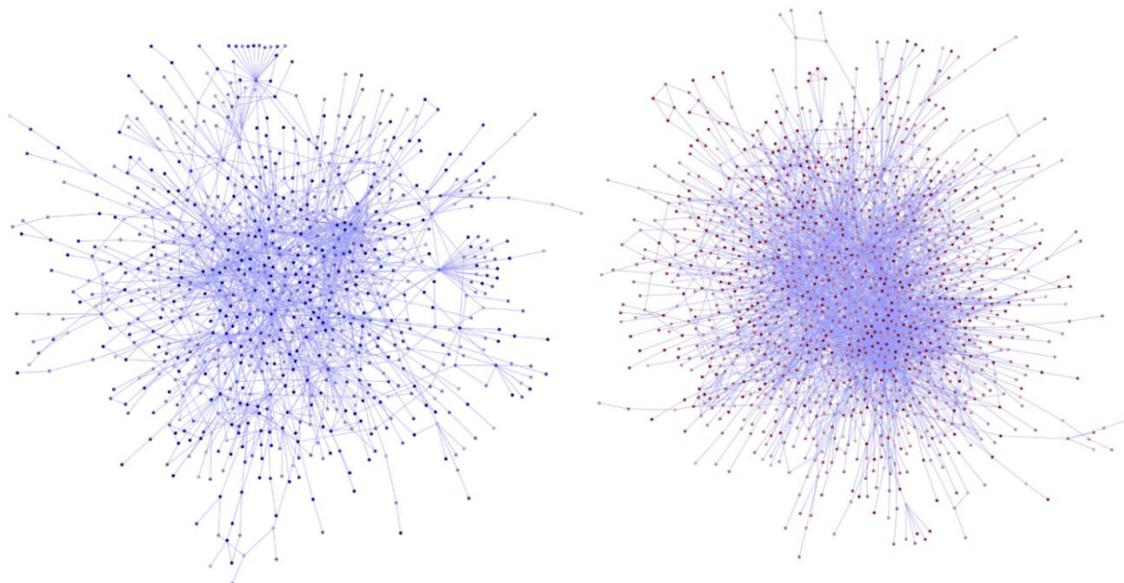


Figura 18: Rede de genes subexpressos (esq.) e superexpressos (dir) de CL22.

CL22					
Subexpressos			Superexpressos		
GO-ID	Description	p-value	GO-ID	Description	p-value
23052	signaling	5.61E-63	90304	nucleic acid metabolic process	2.67E-93
23060	signal transmission	7.11E-58	44260	cellular macromolecule metabolic process	1.65E-92
23046	signaling process	7.11E-58	43170	macromolecule metabolic process	2.14E-78
19226	transmission of nerve impulse	1.48E-44	6139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	2.17E-76
7268	synaptic transmission	2.33E-44	7049	cell cycle	3.26E-61
7267	cell-cell signaling	5.29E-34	34641	cellular nitrogen compound metabolic process	2.30E-58
7154	cell communication	2.84E-32	22402	cell cycle process	8.88E-54
7165	signal transduction	1.93E-30	6807	nitrogen compound metabolic process	5.63E-52
23033	signaling pathway	3.68E-30	10467	gene expression	1.04E-51
51234	establishment of localization	1.83E-29	9987	cellular process	1.15E-49
51179	localization	3.00E-29	16070	RNA metabolic process	7.99E-49
6810	transport	8.30E-29	22403	cell cycle phase	5.44E-47
23034	intracellular signaling pathway	1.76E-24	6259	DNA metabolic process	2.19E-46
65007	biological regulation	2.52E-23	278	mitotic cell cycle	8.34E-46
35556	intracellular signal transduction	6.64E-23	8380	RNA splicing	1.25E-45
43687	post-translational protein modification	2.62E-22	16043	cellular component organization	1.17E-43
7399	nervous system development	7.81E-22	16071	mRNA metabolic process	4.48E-42
50789	regulation of biological process	1.03E-21	44237	cellular metabolic process	3.90E-40
50794	regulation of cellular process	1.59E-20	9059	macromolecule biosynthetic process	2.61E-39
51641	cellular localization	2.40E-20	44238	primary metabolic process	3.56E-39

Tabela 14: 20 termos mais significativos da ontologia das redes de genes diferencialmente expressos em CL22.

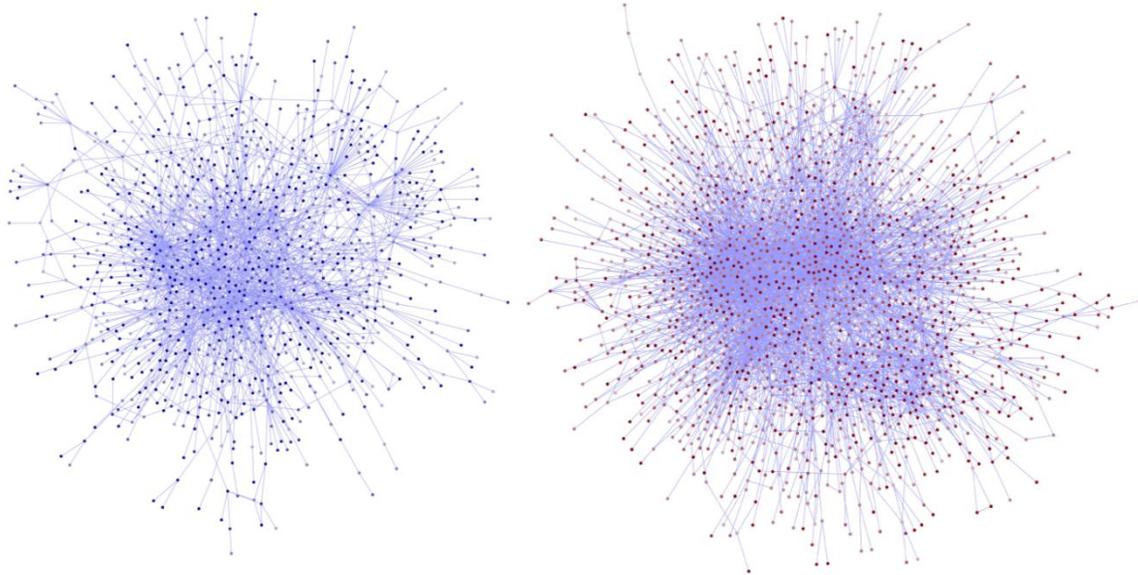


Figura 19: Rede de genes subexpressos (esq.) e superexpressos (dir.) de CL23.

CL23					
Subexpressos			Superexpressos		
GO-ID	Description	p-value	GO-ID	Description	p-value
23052	signaling	3.16E-63	48518	positive regulation of biological process	4.65E-55
23060	signal transmission	1.30E-52	48522	positive regulation of cellular process	2.51E-52
23046	signaling process	1.30E-52	50789	regulation of biological process	1.14E-49
7268	synaptic transmission	7.66E-46	65007	biological regulation	3.49E-49
19226	transmission of nerve impulse	8.14E-46	50794	regulation of cellular process	1.85E-47
7267	cell-cell signaling	1.01E-33	2376	immune system process	6.38E-46
23033	signaling pathway	3.88E-33	48519	negative regulation of biological process	1.84E-43
7154	cell communication	4.36E-31	44260	cellular macromolecule metabolic process	3.54E-43
7399	nervous system development	6.02E-28	6950	response to stress macromolecule metabolic process	4.79E-41
65007	biological regulation	8.18E-28	43170	process	6.84E-41
43687	post-translational protein modification	4.87E-27	9987	cellular process	4.96E-40
51234	establishment of localization	6.27E-27	48523	negative regulation of cellular process	5.49E-40
7165	signal transduction	3.19E-26	42981	regulation of apoptosis	1.12E-37
6810	transport	3.69E-26	43067	regulation of programmed cell death	1.76E-37
51179	localization	1.09E-25	10941	regulation of cell death	2.26E-37
50789	regulation of biological process	1.65E-25	51704	multi-organism process	4.62E-35
50794	regulation of cellular process	2.33E-24	7049	cell cycle	2.78E-34
6464	protein modification process	1.95E-23	7165	signal transduction	3.08E-33
23034	intracellular signaling pathway	2.44E-23	23052	signaling	1.71E-32
6796	phosphate metabolic process	5.30E-21	22402	cell cycle process	2.81E-32

Tabela 15: 20 termos mais significativos da ontologia das redes de genes diferencialmente expressos em CL23.

As Alterações Tumorais Repercutem no Funcionamento de Redes Gênicas Relativas a Processos Biológicos.

As alterações transcricionais ocorridas nos tumores tem impacto sobre processos biológicos importantes para a tumorigênese, apresentando perfis transcricionais ligeiramente diferentes em cada uma das classes observadas.

Observam-se alterações transcricionais em diferentes níveis nas redes de genes de controle da apoptose e estabilidade genômica (**Fig. 20**), bem como nos genes relacionados ao NFkB – Nas redes de interatores (**Fig. 21**) e genes alvo do NFkB (**Fig. 22**), e NFkB, Resposta Redox e Sobrevivência (**Fig. 24**), (e na rede de apoptose e estabilidade genômica na qual ele participa - (**Fig. 20**) – e no metabolismo energético (**Fig. 23**), onde é clara a atenuação da expressão de genes relacionados com a fosforilação oxidativa.

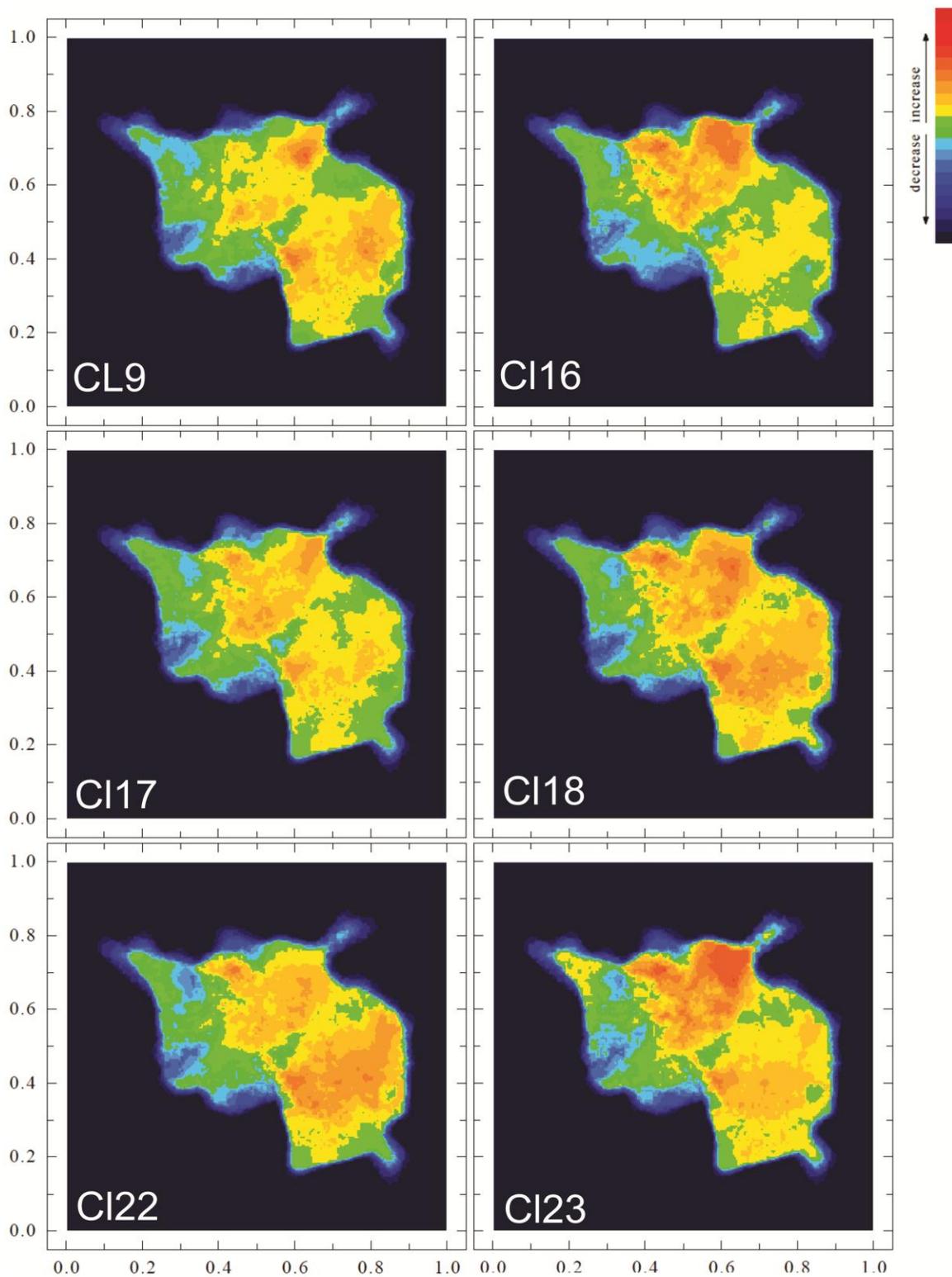


Figura 20: Panorama transcricional da rede apoptose e estabilidade genômica – as duas dimensões são dadas pela rede (**fig. 3**), e a 3ª, em escala de cor, representa a expressão gênica, relativa ao controle.

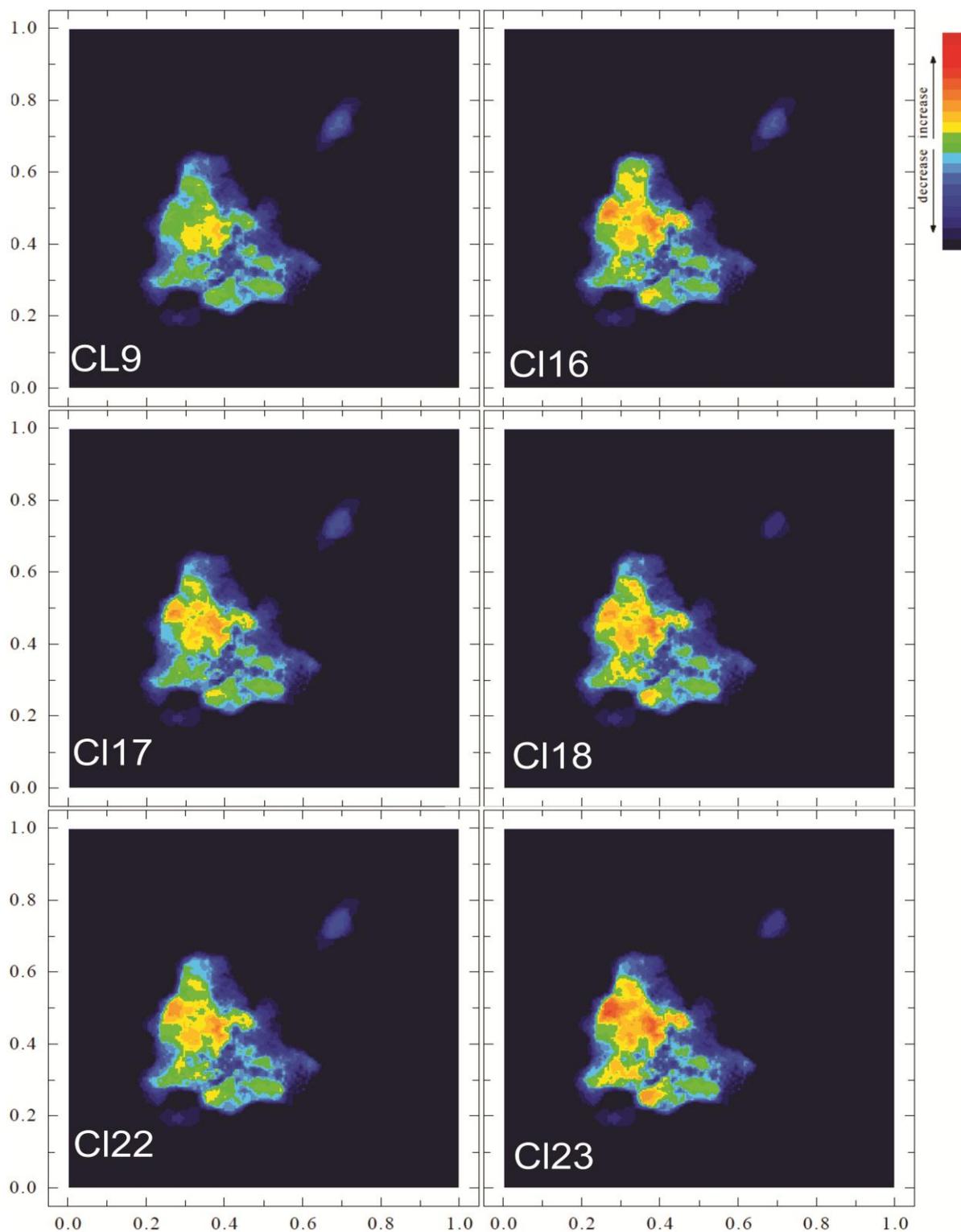


Figura 21: Panorama transcricional da rede de genes que interagem com fator de transcrição NFKB – as duas dimensões são dadas pela rede (**fig. 4**), e a 3ª, em escala de cor, representa a expressão gênica, relativa ao controle.

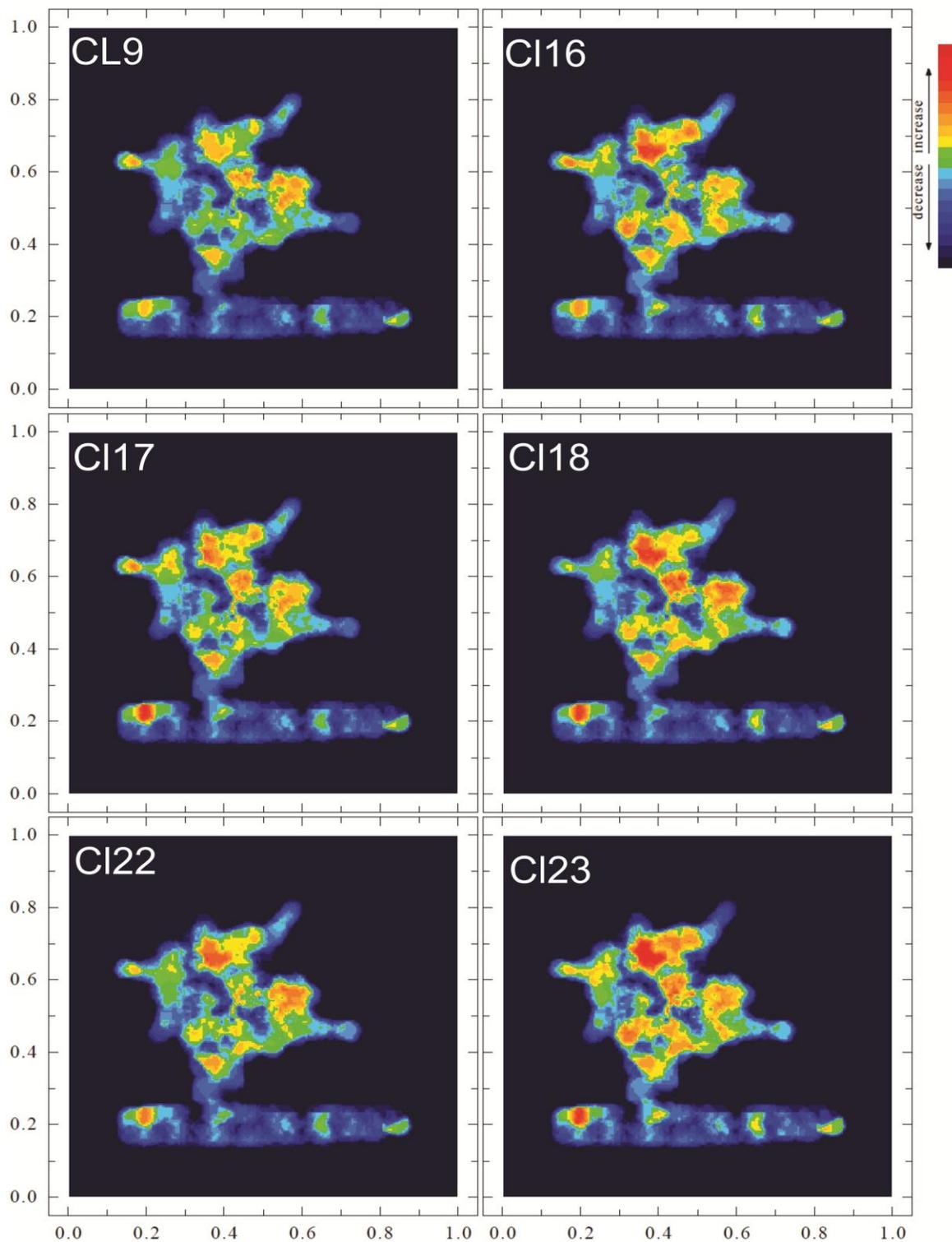


Figura 22: Panorama transcricional da rede de genes transcritos pelo NFKB – as duas dimensões são dadas pela rede (**fig. 5**), e a 3ª, em escala de cor, representa a expressão gênica, relativa ao controle.

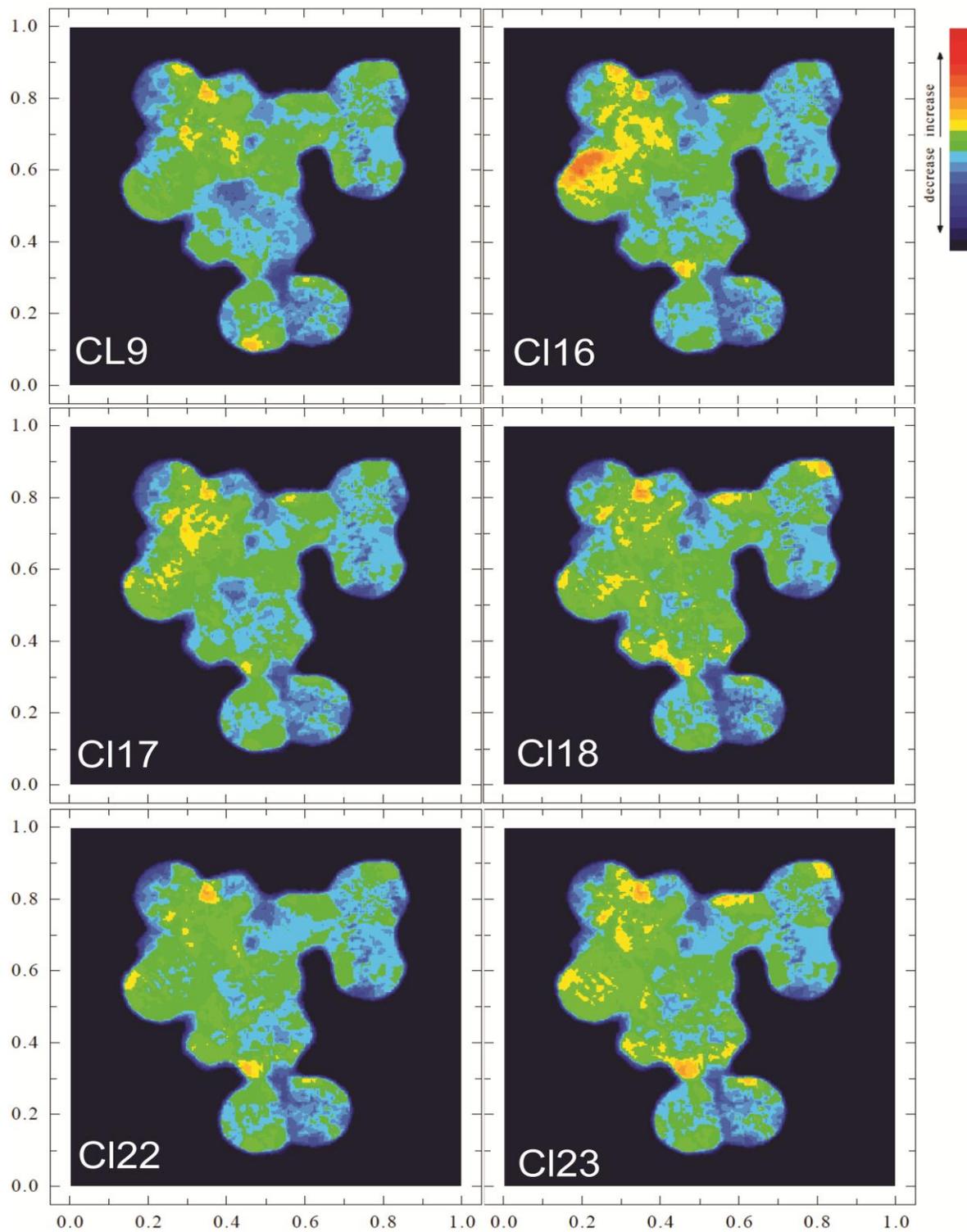


Figura 23: Panorama transcricional da rede do metabolismo energético – as duas dimensões são dadas pela rede (**fig. 6**), e a 3ª, em escala de cor, representa a expressão gênica, relativa ao controle.

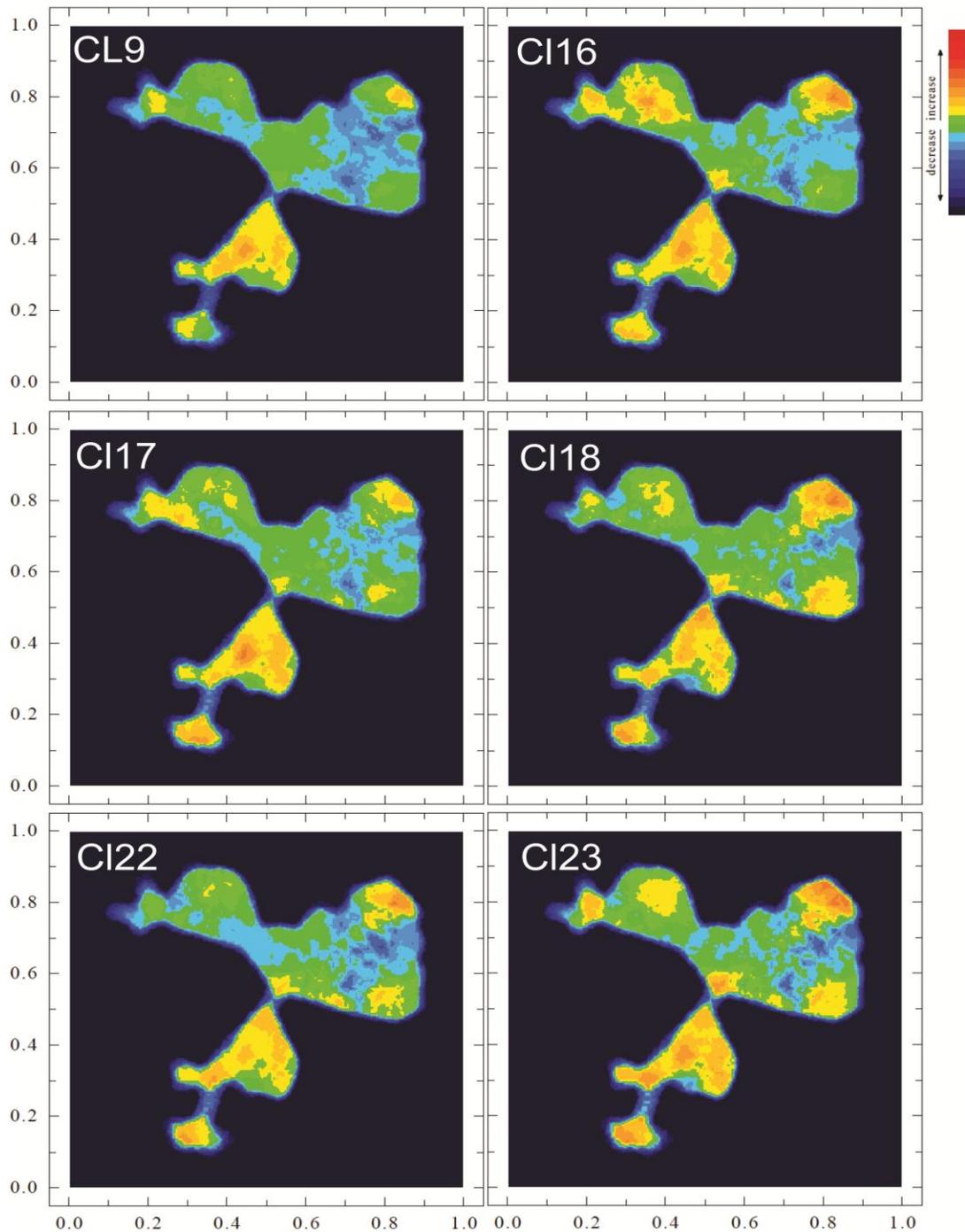


Figura 24: Panorama transcricional da rede composta por: genes do fator de transcrição NF κ B, genes de sobrevivência, glicólise e resposta a estresse – as duas dimensões são dadas pela rede (**fig. 8**), e a 3ª, em escala de cor, representa a expressão gênica, relativa ao controle.

DISCUSSÃO

Os processos que levam a transformação celular induzem uma série de reestruturações funcionais em decorrência da nova condição e do microambiente no qual o tumor irá se desenvolver. Tal qual o ambiente natural, os “ocupantes” – as células tumorais e a população de células “recrutadas” pelo tumor – deste ambiente são capazes de alterar suas condições (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Uma célula tumoral é um sistema cujo “comportamento” se desvincula dos sinais regulatórios do organismo, esta desvinculação ocorre ao passo que esta célula deixa de seguir seu programa de diferenciação e não mais cumpre sua programação original. Em gliomas, este desligamento é representado pela atenuação da expressão de genes relacionados com as funções gliais – predominantes no módulo 19 do ordenamento (**Figura 1, Tabela 1, Figura 9**) e de moléculas de adesão (**Tabelas 3 a 7**). A atenuação da expressão de moléculas de adesão possibilita a desvinculação física do tecido glial e dificulta o reconhecimento por parte do sistema imune – que prontamente agiria na retirada de células “aberrantes”.

As aberrações no padrão transcricional de uma célula são consequência de uma série alterações na estrutura de organização e acesso à informação gênica. Mutações em fatores de transcrição, ou proteínas de vias de sinalização que levem a estes foram identificadas em uma série de trabalhos (LOEB; LOEB, 2000). Estas mutações têm efeito sobre a transdução de sinais que determinariam a resposta da célula frente a estímulos, sejam eles intrínsecos (advindos de algum mecanismo de sensoriamento intracelular) ou extrínsecos (sinais extracelulares/sistêmicos). O Fator de Transcrição TP53 é considerado uma proteína supressora de tumor devido ao fato de conectar os mecanismos de manutenção/sensoriamento do genoma e a apoptose, e a perda de função desconectaria estes dois mecanismos (CASTRO et al., 2008). Na **Figura 20** observam-se alterações transcricionais na rede de genes que compõem estes mecanismos. As diferentes intensidades na atividade transcricional ao longo das

classes, na região da rede relacionada com a estabilidade genômica pode ser atribuída à dimensão do dano genômico que está ocorrendo nestas células. Observa-se também que a atividade de manutenção de telômeros apresenta um aumento considerável na expressão de seus genes **Figura 13**, o que sugere um aumento na atividade de reconstituição das extremidades cromossômicas, que estaria relacionado com a manutenção da capacidade replicativa. Os mecanismos de reparo são importantes na manutenção da estrutura cromossômica da célula. A ativação destes mecanismos é fundamental na contenção dos danos ao DNA causados pelos estresses mitótico e oxidativo.

O estresse mitótico advém da incapacidade da célula de reorganizar sua estrutura cromossômica a tempo da divisão, ocasionado tanto pelo grau de desordem do cariótipo (CASTRO et al., 2006), quanto pela ineficiência dos mecanismos de “*check-point*” que barrariam o processo de divisão enquanto o genoma não estivesse “organizado”. Com a ineficiência destes mecanismos, ocorrem divisões onde o material genético não é segregado corretamente, gerando células com aberrações cromossômicas tanto numéricas (aneuploidia) quanto estruturais (perda ou fusão de braço cromossômico) (BANNON; GEE, 2009). Ainda que este seja um mecanismo importante na geração de diversidade genética, é um dos maiores responsáveis pela baixa viabilidade divisional de células em tumores. Que, muitas vezes incapazes de ativar a maquinaria apoptótica, acabam morrendo por necrose.

A necrose consiste no extravasamento de conteúdo intracelular, um dos grandes indutores de inflamação (CORDON-CARDO; PRIVES, 1999). A inflamação é um potente agente modificador das condições do microambiente tumoral (MELILLO; SEMENZA, 2006), em uma resposta sistêmica que é capaz de eliminar a população de células sensíveis ao chamado “estresse inflamatório” – que consiste na secreção de fatores indutores de morte. Durante a atividade inflamatória ocorre a secreção de Peróxido de Hidrogênio e fatores como TNF-alfa, no microambiente tumoral. No entanto, algumas células do tumor são capazes de se favorecer da condição pró-inflamatória. Peróxido de Hidrogênio e TNF-alfa são alguns agentes estressores dos quais o sistema imune se utiliza na

eliminação de células “estranhas” (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010) – ambos são ativadores do fator nuclear de transcrição Kappa-B (NFkB), o qual ativa a transcrição de diversos genes relacionados com a resposta a agentes estressores, participando no processo de decisão do destino celular entre sobrevivência/proliferação ou morte da célula.

Dentre os genes transcritos pelo NFkB, diversos deles estão associados com processos neoplásicos como fatores de sobrevivência (antiapoptóticos), fatores de vascularização (VEGF), genes codificantes de metaloproteinases de matriz (MMPs) e genes da via glicolítica. A alteração neste fator já foi descrita em tumores gliais em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, que obteve sucesso na regressão de tumores gliais através da inibição deste fator, associada à terapia convencional, em um modelo alográfico de Glioblastoma (ZANOTTO-FILHO et al., 2011),. A atividade transcricional dos genes que interagem com e/ou são codificados por este fator encontra-se bastante alterada em todas as classes (**Figuras 20 e 21**), no entanto, são observáveis algumas diferenças no “espalhamento transcricional” destas redes. O grupo de genes codificados por este fator envolvido com a sobrevivência da célula encontra-se com a transcrição bastante alterada em todos os grupos (**Figura 13 – REACTOME_NFKB_IS_ACTIVATED_AND_SIGNALS_SURVIVAL**), o que contraporia sinais pró-apotóticos, sejam eles extrínsecos ou intrínsecos.

No entanto, outros fatores contribuem para que tumores contornem os mecanismos de morte. A apoptose é um processo bastante dispendiosos do ponto de vista energético e depende majoritariamente do ATP produzido pela Fosforilação Oxidativa, no entanto, a produção de ATP por fosforilação oxidativa é um processo que se encontra atenuado nos tumores gliais, na **Figura 23**, pode-se observar uma redução sistêmica na transcrição gênica das porções da rede relacionadas com este processo. Em contrapartida, para a célula tumoral esta atenuação auxilia na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (atenuação do estresse oxidativo) e no desvio de metabólitos para outras rotas bioquímicas, como a via das pentoses, que atua no fornecimento de intermediários para a síntese de ácidos nucléicos para os processos de reparo e síntese de DNA,

síntese de RNA e atua também na renovação de NADP (RICHTER et al., 2012), muito importante para os mecanismos celulares antioxidantes.

O aumento do consumo de glicose desacompanhado do aumento do consumo de oxigênio, conforme descrito por Otto Warburg, aponta para a glicólise enquanto supridora das demandas energéticas (e de biomassa) de tumores. Na **Figura 13** observa-se o aumento da atividade transcricional de genes relacionados com o transporte de glicose, para suprir essa demanda. No entanto, a demanda por glicose é bastante elevada no tecido nervoso, impondo uma competição entre as células sadias e o tumor. Alguns autores (BASANTA et al., 2008) sugerem que estas “competições” estariam por trás do programa de transformação “transição epitélio-mesênquima”, que confere propriedades metastáticas ao tumor. Na **Figura 13** observa-se o aumento da expressão de genes relacionados a este programa.

Ainda que as células tumorais sejam capazes de sobreviver frente à hostilidade do microambiente tumoral, boa parte delas encontra-se muito próximas do limiar de estresse aceitável para a sobrevivência. Frente a isso, observa-se um pronunciado aumento na expressão de genes relacionados com as defesas antioxidantes da célula (**Figuras 13 e 24**), que acompanha as alterações na expressão dos genes de sobrevivência e do NFkB, bem como em alguns genes da via glicolítica, conforme observado na **figura 24**. As interações que envolvem fatores de transcrição, resposta a estresse e metabolismo que estejam com suas funções alteradas são potenciais alvos para o direcionamento de terapias. Agir nestas rotas de maneira conjunta pode vir a ser uma estratégia na eliminação de células tumorais.

CONCLUSÕES

Conclusões Gerais:

O trabalho foi capaz de identificar as assinaturas transcricionais de tumores gliais, identificando, dentre subgrupos definidos por agrupamento de perfil transcricional, diferenças no grau de alteração e número de processos biológicos afetados durante a transformação destas células. Tal qual acontece em análises histopatológicas, quanto mais alterado estiver o perfil transcricional do tumor, pior é o prognóstico. O discernimento de classes utilizado por este trabalho sugere uma reformulação na maneira em que são feitas as abordagens terapêuticas, indicando que tumores de um mesmo grupo histológico podem possuir padrões transcricionais (e portanto funcionais) distintos, o que sugere que cada classe deva ser tratada de uma maneira distinta.

Outro ponto importante se refere ao número e a complexidade de alterações funcionais que ocorrem nas células tumorais: A diversidade genética de células tumorais aumenta a probabilidade de existência de células resistentes a um determinado tratamento, o que fomenta a formulação de terapias “ortogonais”, que venham a agir em diversos processos biológicos “ao mesmo tempo”, aumentando a probabilidade de levar um número maior de células tumorais à morte.

Conclusões Pontuais:

- O perfil transcricional de uma biópsia tumoral é capaz de discernir entre grupos de tumores quanto a sua agressividade – tumores mais agressivos possuem um perfil transcricional mais distinto do controle do que os menos.
- Tumores Gliais de uma mesma origem histológica podem apresentar perfis transcricionais distintos.
- O programa de transformação de uma célula segue um padrão não ordenado de aquisição de capacidades tumorais, que se manifestam por meio de alterações transcricionais em diferentes rotas ou em diferentes intensidades entre as classes de tumores avaliadas.
- As diferenças transcricionais entre os grupos podem ser observadas em nível de processos biológicos, nos quais cada um dos grupos apresentou diferentes níveis de alteração.

PERSPECTIVAS

Visto que as alterações fisiológicas de células tumorais ocorrem de maneira desigual em tumores de uma mesma origem histológica, são necessários estudos que explorem estas alterações de uma maneira realmente quantitativa. O tratamento de neoplasias é um grande desafio à ciência, a complexidade de fatores que envolvem este processo requer esforços de estudos exploratórios que venham a reconstituir os padrões de alteração destas células de maneira a elencar uma série de alvos, a fim de conduzir um número maior de células à morte, utilizando-se da combinação de terapias direcionadas a estes alvos. A combinação de terapias deve ser feita de maneira ortogonal (LUO et al. 2010), onde cada uma agiria como um filtro, reduzindo a população de células do tumor em cada um destes filtros. Tumores gliais requerem uma atenção especial por parte destes estudos, considerando as possíveis consequências de danos ao tecido nervoso. Este trabalho seguirá na avaliação de transformações ocorridas em algumas rotas bioquímicas elencadas como possíveis alvos de terapias antitumorais, em espécimes tumorais de pacientes submetidos a ressecção de gliomas.

BIBLIOGRAFIA

1. INCA – Instituto Nacional do Cancer - Câncer no Brasil: Dados dos Registros de Base Populacional – Online, 2012.
2. ASHBURNER M. et. al.. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet**, v. 25, n. 1, p. 25-29, May, 2000.
3. BARABASI A. L. & Oltvai, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 2, p. 101-113, Feb, 2004.
4. GAUTIER, L. Affy: analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. **Bioinformatics** v. 20, n. 3 p. 307-315, Feb. 2004.
5. CASTRO MAA, RedeR: R/Bioconductor package for representing modular structures, nested networks and multiple levels of hierarchical associations. **Genome Biology** v.13:R29. 2012.
6. SMYTH, GK, Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor', **Springer**, New York, p. 397-420.
7. BENETTI, FPC. Homo sapiens : análise de expressão gênica por Transcriptograma – Monografia, **Repositório digital LUME** – UFRGS, 2010.
8. BASANTA, D. et al. Evolutionary game theory elucidates the role of glycolysis in glioma progression and invasion. **Cell Proliferation**, p. 980-987, 2008.

9. CASTRO, M. A A et al. Evolutionary origins of human apoptosis and genome-stability gene networks. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 19, p. 6269-83, nov. 2008.
10. CASTRO, M. A A et al. ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 11, p. 1468-9, 1 jun. 2009.
11. CASTRO, M. A. A. et al. Chromosome aberrations in solid tumors have a stochastic nature. **Mutation Research**, v. 600, p. 150-164, 2006.
12. CORDON-CARDO, C.; PRIVES, C. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 10, p. 1367-70, 15 nov. 1999.
13. DALMOLIN, R. J. S. et al. Evolutionary plasticity determination by orthologous groups distribution. **Biology direct**, v. 6, n. 1, p. 22, jan. 2011.
14. GRAVENDEEL, L. A M. et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. **Cancer research**, v. 69, n. 23, p. 9065-72, 1 dez. 2009.
15. GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Review Immunity , Inflammation , and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.
16. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 4 mar. 2011.
17. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

18. KHONG, H. T.; RESTIFOU, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 999-1005, 2006.
19. LAAN, M. J. VAN DER; POLLARD, K. S. A new algorithm for hybrid clustering of gene expression data with visualization and the bootstrap. **Journal of Statistical Planning and Inference**, v. 117, p. 275-303, 2003.
20. LOEB, K. R.; LOEB, L. A. Significance of multiple mutations in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 379-385, 2000.
21. LUO, J.; SOLIMINI, N.; ELLEDGE, S. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2010.
22. MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BINGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 16, p. 3448-9, 15 ago. 2005.
23. MELILLO, G.; SEMENZA, G. L. Meeting Report: Exploiting the Tumor Microenvironment for Therapeutics. **Cancer Research**, v. 1, n. 9, p. 4558-4560, 2006.
24. MOMBACH, C. M.; ALMEIDA, R. M. C. DE; CASTRO, M. A. A. Impaired expression of NER gene network in sporadic solid tumors. **Access**, v. 35, n. 6, p. 1859-1867, 2007.
25. RYBARCZYK-FILHO, J. L. et al. Towards a genome-wide transcriptogram: the *Saccharomyces cerevisiae* case. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 8, p. 3005-16, abr. 2011.

26. SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis : A knowledge-based approach for interpreting genome-wide transcription profiles. **PNAS**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.
27. TIERI, P. et al. Charting the NF- κ B pathway interactome map. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32678, jan. 2012.
28. VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. **Molecular Cell**, p. 1-14, 2007.
29. WESTERHOFF, H. V; PALSSON, B. O. The evolution of molecular biology into systems biology. **October**, v. 22, n. 10, p. 1249-1252, 2004.
30. ZANOTTO-FILHO, A. et al. NF κ B inhibitors induce cell death in glioblastomas. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 412-24, 1 fev. 2011.