

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs ESTRATIFICADA POR SEXO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA PULMONAR

 Bethina da Rocha Camargo¹
 Bruna Caroline Silva Previato²
 Felipe de Almeida Camargo³
 Carlo Antônio de Freitas Lüders⁴
 Vanessa das Graças Pereira de Souza⁵
 Patricia Pintor dos Reis⁶
 Rogerio Antonio de Oliveira⁷

RESUMO: Introdução: Diferenças biológicas relacionadas ao sexo podem contribuir para a heterogeneidade molecular do LUAD, incluindo variações na expressão de miRNAs. **Objetivo:** Identificar miRNAs associados ao LUAD de acordo com o sexo e avaliar suas associações com a sobrevida e vias biológicas enriquecidas. **Métodos:** Dados de expressão de miRNAs e dados clínicos do *The Cancer Genome Atlas* foram analisados separadamente para homens e mulheres. Foram realizadas análises de expressão diferencial, sobrevida e enriquecimento de vias biológicas. **Resultados:** Foram identificados 130 miRNAs diferencialmente expressos em homens e 208 em mulheres. Dois miRNAs foram associados à sobrevida no grupo masculino e oito no feminino. A análise de enriquecimento revelou perfis funcionais distintos entre os grupos. **Conclusão:** Os achados exploratórios indicam diferenças relacionadas ao sexo nos perfis de miRNAs e em suas associações com a sobrevida e vias biológicas no LUAD, fornecendo subsídios para futuras investigações sobre seu potencial prognóstico.

Palavras-chave: Bioestatística; Câncer de pulmão; Análise de sobrevivência; Enriquecimento de vias biológicas; Biomarcadores.

* **Autor correspondente:** Ariel Perez Buchhammer. E-mail: arielplate84@gmail.com

1 Faculdade SENAI – Campus Suíço-Brasileira, São Paulo, SP (Brasil). E-mail: bethina.camargo@unesp.br

2 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São Paulo, SP (Brasil). E-mail: b.previato@unesp.br

3 Faculdade SENAI – Campus Suíço-Brasileira, São Paulo, SP (Brasil). E-mail: felipe.a.camargo@unesp.br

4 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São Paulo, SP (Brasil). E-mail: carlo.luders@unesp.br

5 BC Cancer Research Centre, Integrative Oncology, São Paulo, SP (Brasil). E-mail: vg.souza@unesp.br

6 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São Paulo, SP (Brasil). E-mail: patricia.reis@unesp.br

7 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São Paulo, SP (Brasil). E-mail: rogerio.oliveira@unesp.br

Submissão: 06/05/2026

Aceite: 23/07/2026

ISSN: 3086-5336

Editores: Prof. Dr. Elias Porto e Profa. Dra. Natália Cristina de Oliveira (Centro Universitário Adventista (UNASP), São Paulo).

Como citar: Camargo, B. da R., Previato, B. C. S., Camargo, F. . de A., Lüders, C. A. de F., Souza, V. das G. P. de, Reis, P. P. dos, & Antonio de Oliveira, R. (2026). Análise da Expressão de miRNAs Estratificada por Sexo em Pacientes com Adenocarcinoma Pulmonar. *Journal of Interdisciplinary Lifestyle Studies*, 14(lifestyle), e02198. <https://doi.org/10.19141/jils.v14ilifestyle.2198>



Analysis of miRNA Expression Stratified by Sex in Patients with Lung Adenocarcinoma

ABSTRACT: Introduction: Sex-related biological differences may contribute to the molecular heterogeneity of LUAD, including variations in miRNA expression. **Objective:** To identify sex-specific miRNAs associated with LUAD and evaluate their associations with patient survival and enriched biological pathways. **Methods:** miRNA expression and clinical data from *The Cancer Genome Atlas* were analyzed separately for male and female patients. Differential expression, survival, and pathway enrichment analyses were performed. **Results:** A total of 130 differentially expressed miRNAs were identified in males and 208 in females. Two miRNAs were associated with survival in the male group and eight in the female group. Pathway enrichment analysis revealed distinct functional profiles between the groups. **Conclusion:** These exploratory findings indicate sex-related differences in miRNA expression patterns and their associations with survival and biological pathways in LUAD, providing a basis for future studies investigating their potential prognostic relevance.

Keywords: Biostatistics; Lung cancer; Survival Analysis; Pathway enrichment; Biomarkers.

Análisis de la Expresión de MicroARN Estratificada por Sexo en Pacientes con Adenocarcinoma Pulmonar

RESUMEN: Introducción: Las diferencias biológicas relacionadas con el sexo pueden contribuir a la heterogeneidad molecular del LUAD, incluidas las variaciones en la expresión de miARN. **Objetivo:** Identificar miARN asociados al LUAD según el sexo y evaluar su asociación con la supervivencia de los pacientes y las vías biológicas enriquecidas. **Métodos:** Se analizaron por separado datos de expresión de miARN y datos clínicos del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para hombres y mujeres. Se realizaron análisis de expresión diferencial, supervivencia y enriquecimiento de vías biológicas. **Resultados:** Se identificaron 130 miARN diferencialmente expresados en hombres y 208 en mujeres. Dos miARN se asociaron con la supervivencia en el grupo masculino y ocho en el grupo femenino. El análisis de enriquecimiento reveló perfiles funcionales distintos entre ambos grupos. **Conclusión:** Estos hallazgos exploratorios indican diferencias relacionadas con el sexo en los patrones de expresión de miARN y en sus asociaciones con la supervivencia y las vías biológicas en el LUAD, proporcionando una base para futuras investigaciones sobre su posible relevancia pronóstica.

Palabras clave: Bioestadística; Cáncer de pulmón; Análisis de supervivencia; Enriquecimiento de vías biológicas; Biomarcadores.



INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma pulmonar (LUAD) é o subtipo histológico mais comum do câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), que corresponde a aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão, sendo o LUAD responsável por cerca de 40% de todos os casos dessa neoplasia (Zappa et al., 2016; Myers et al., 2022). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, o LUAD permanece associado à elevada mortalidade, principalmente devido ao diagnóstico tardio decorrente de sintomas inespecíficos (Imielinski et al., 2012). Nesse cenário, a identificação de biomarcadores moleculares que reflitam a heterogeneidade tumoral é fundamental para aprimorar a avaliação prognóstica e o manejo personalizado da doença.

O sexo biológico representa uma importante fonte de variabilidade no câncer, influenciando a incidência, o prognóstico, os mecanismos moleculares e a resposta ao tratamento por meio de fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e imunológicos (Lopes-Ramos et al., 2020). No câncer de pulmão, homens apresentam, em geral, maiores taxas de incidência e mortalidade, enquanto mulheres tendem a exibir prognóstico mais favorável, apesar do aumento recente da incidência nessa população (May et al., 2023; Fu et al., 2023; Poleri, 2022; Ragavan e Patel, 2022; Stabellini et al., 2022).

Essas diferenças também se manifestam no nível molecular. Alterações na expressão gênica, na regulação imunológica e em redes regulatórias específicas para cada sexo têm sido descritas no LUAD (Li et al., 2023; Saha et al., 2024). Além disso, modelos transcriptômicos estratificados por sexo apresentam desempenho superior às abordagens que analisam homens e mulheres em conjunto na identificação de biomarcadores para o câncer de pulmão em estágio inicial, sugerindo que análises não estratificadas podem mascarar assinaturas moleculares relevantes (Liu et al., 2021).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA (aproximadamente 22 nucleotídeos) que regulam a expressão gênica e participam de processos fundamentais relacionados ao câncer, como proliferação, metabolismo, diferenciação e controle do ciclo celular (Griffiths-Jones, 2004; Jansson et al., 2012). Sua expressão pode variar entre homens e mulheres em função de interações envolvendo cromossomos sexuais, hormônios e mecanismos epigenéticos (Caserta et al., 2023). Além disso, padrões de expressão de miRNAs associados ao sexo já foram descritos em diferentes tipos de câncer, indicando seu potencial papel nas diferenças biológicas observadas entre pacientes do sexo masculino e feminino (Haranguş et al., 2022; Caserta et al., 2023).

Embora os miRNAs sejam amplamente investigados como biomarcadores no LUAD, estudos que integrem análise de expressão diferencial estratificada por sexo, análise de sobrevida e enriquecimento de vias biológicas ainda são limitados. Assim, a investigação de perfis de miRNAs específicos para cada sexo pode ampliar a compreensão da heterogeneidade molecular do LUAD e fornecer subsídios para estudos futuros sobre seu potencial valor prognóstico.

Dessa forma, este estudo exploratório teve como objetivo identificar miRNAs específicos de cada sexo associados ao adenocarcinoma pulmonar e avaliar suas associações com a sobrevida dos pacientes e com vias biológicas enriquecidas. Por meio da integração das análises de expressão diferencial, sobrevida e enriquecimento funcional, realizadas separadamente em pacientes do sexo masculino e feminino, buscou-se caracterizar a heterogeneidade molecular relacionada ao sexo e gerar hipóteses para futuras investigações experimentais e clínicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo e conjunto de dados do TCGA

Este estudo exploratório utilizou dados públicos de expressão de miRNAs e informações clínicas do projeto The Cancer Genome Atlas – Lung Adenocarcinoma (TCGA-LUAD), obtidos por meio do Genomic Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>; acessado em junho de 2022) (TCGA, 2018). O conjunto de dados compreendeu 553 pacientes e a expressão de 709 miRNAs. Foram incluídos pacientes com informações sobre o sexo e dados de expressão de miRNAs, posteriormente estratificados em grupos masculino (LUAD-M; $n = 259$) e feminino (LUAD-F; $n = 294$).

As variáveis clínicas incluíram sexo, tipo de tecido, estágio tumoral, estado vital, etnia, classificação histológica, tecido ou órgão de origem, idade e tempo de acompanhamento. O estágio tumoral foi agrupado em inicial (I–IIb) e avançado (IIIa–IV), enquanto dados ausentes foram classificados como “não informado”. Como foram utilizados dados processados disponibilizados pelo TCGA/GDC, não foi realizado controle de qualidade adicional das leituras brutas de sequenciamento. A consistência e a disponibilidade dos dados foram verificadas previamente às análises, conduzidas no software R (versão 4.1.1).

Análise de expressão diferencial, enriquecimento de vias e análise de sobrevida

A análise de expressão diferencial foi realizada para LUAD-M e LUAD-F por meio da comparação entre tecidos tumorais (T) e tecidos adjacentes histologicamente normais (N), utilizando o teste de Wilcoxon–Mann–Whitney implementado pela função *wilcox.test()* do R. Esse teste foi escolhido por não assumir normalidade na distribuição da expressão dos miRNAs. Para controlar o problema de múltiplas comparações, foi aplicada a correção de Bonferroni (Weisstein, 2004), adotando-se $p < 0.00007$ ($0.05/709$) como limiar de significância. Os miRNAs que atenderam a esse critério foram considerados diferencialmente expressos.

A análise de enriquecimento funcional foi realizada com a ferramenta miEAA 2.1 (Aparicio-Puerta et al., 2023). As vias do KEGG com $p < 0.05$ foram consideradas para interpretação exploratória, sem correção adicional para múltiplos testes.

A análise de sobrevida utilizou o tempo de acompanhamento (dias) e o estado vital dos pacientes. Para cada DE-miRNA, os pacientes foram dicotomizados em grupos de alta e baixa expressão utilizando a mediana da expressão específica para cada sexo como ponto de corte exploratório, uma vez que não existe um limiar clinicamente estabelecido. As curvas de Kaplan–Meier (Kaplan and Meier, 1958) foram comparadas pelo teste de log-rank (Mantel, 1966), considerando $p < 0.05$. Devido ao caráter exploratório do estudo, as associações significativas foram interpretadas como potenciais marcadores prognósticos, e não como biomarcadores clinicamente validados.

As análises foram realizadas no R (v. 4.1.1) utilizando os pacotes *survival* (Therneau, 2022), *survminer* (Kassambara et al., 2021), *stringi* (Gagolewski, 2022) e *ggplot2* (Wickham, 2009).



RESULTADOS E DISCUSSÕES

Características clínicas

A coorte TCGA-LUAD foi composta por 553 pacientes, sendo 294 do sexo feminino e 259 do sexo masculino. A maioria das amostras correspondeu a tecido tumoral, e a doença em estágio inicial predominou em ambos os conjuntos de dados estratificados por sexo. A idade média foi semelhante entre mulheres ($65,48 \pm 10,23$ anos) e homens ($65,15 \pm 9,74$ anos), com tempos médios de acompanhamento de 652 e 620,5 dias, respectivamente. Associações significativas com o tipo de tecido foram observadas para etnia em ambos os conjuntos de dados (LUAD-F, $p < 0,001$; LUAD-M, $p = 0,047$) e para estado vital em LUAD-F ($p < 0,001$), enquanto não foram observadas associações significativas para órgão de origem, estágio tumoral ou subtipo histológico (Tabela 1).

Tabela 1. Associações entre as características clínicas e o tipo de tecido nos conjuntos de dados TCGA-LUAD estratificados por sexo.

Variável	LUAD-F valor de p	LUAD-M valor de p
Estado vital	< 0,001	0,780
Etnia	< 0,001	0,047
Órgão de origem	0,956	0,770
Estágio Tumoral	0,566	0,700
Subtipo histológico	0,305	0,680

Teste do qui-quadrado de Pearson; o teste exato de Fisher foi aplicado quando apropriado.

Análises de miRNA estratificadas por sexo

A análise de expressão diferencial identificou 130 DE-miRNAs em LUAD-M, incluindo 100 miRNAs superexpressos e 30 subexpressos, e 208 DE-miRNAs em LUAD-F, incluindo 191 miRNAs superexpressos e 17 subexpressos. Dentre esses, 98 DE-miRNAs foram compartilhados entre os sexos, enquanto 32 foram exclusivos de LUAD-M e 110 exclusivos de LUAD-F (Figura 1A).

Entre os dez DE-miRNAs com os menores valores de p em cada conjunto de dados, cinco foram compartilhados entre os sexos (miR-21-5p, miR-21-3p, miR-210-3p, miR-301a-5p e miR-409-5p), enquanto cinco foram específicos de cada sexo (Figura 1B e Tabela 2). A maioria dos DE-miRNAs mais significativamente associados apresentou superexpressão no tecido tumoral; miR-490-3p e miR-144-5p foram os únicos miRNAs subexpressos entre os dez principais em LUAD-M.

Tabela 2. Dez miRNAs diferencialmente expressos mais significativos, de acordo com a significância estatística, em LUAD-M e LUAD-F.

LUAD-M			LUAD-F		
DE-miRNAs	Medianas		DE-miRNAs	Medianas	
	N	T		N	T
miR-210-3p↑	68868	167346	miR-21-5p↑	492287	746722
miR-21-5p↑	21.3	740498	miR-183-5p↑	346410	632521
miR-1287-3p↑	1.5	41604	miR-21-3p↑	189753	375476
miR-301a-5p↑	1	36243	miR-210-3p↑	51215	170472
miR-21-3p↑	214660	386108	miR-182-5p↑	327483	581772
miR-409-5p↑	2	38986	miR-301a-5p↑	1	37113
miR-3607-3p↑	17630	119669	miR-33b-5p↑	1	37114
miR-616-5p↑	1	32540	miR-183-3p↑	0	19932
miR-490-3p↓	17628	0	miR-29b-1-5p↑	4	66913
miR-144-5p↓	242166	101718	miR-409-5p↑	1	36236

↑ e ↓ representam superexpressão e subexpressão, respectivamente.

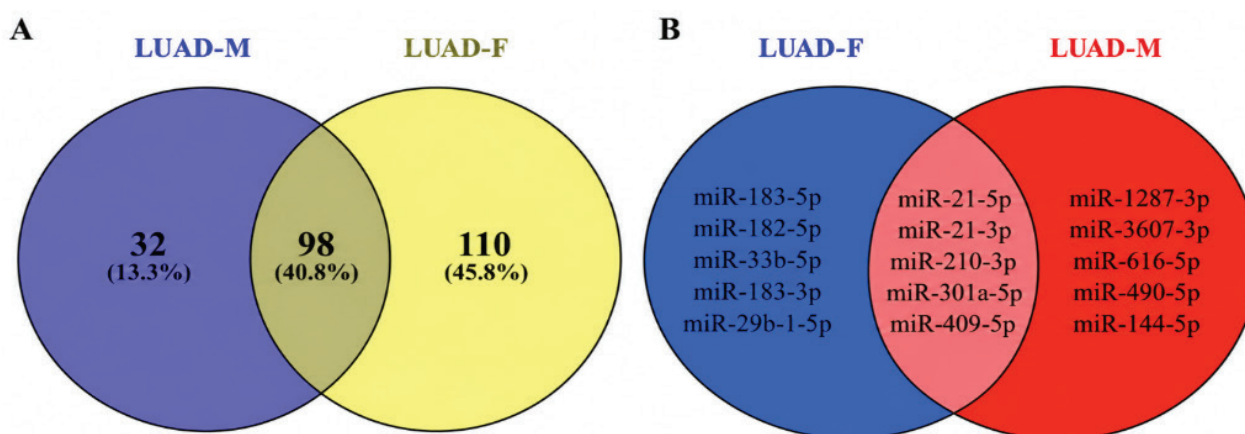


Figura 1. Comparação dos miRNAs diferencialmente expressos entre LUAD-M e LUAD-F. (A) Diagrama de Venn mostrando a sobreposição dos DE-miRNAs identificados em LUAD-M e LUAD-F. (B) Diagrama de Venn mostrando a sobreposição entre os dez DE-miRNAs com os menores valores de p em cada conjunto de dados estratificado por sexo.

A análise de enriquecimento de vias identificou 14 vias enriquecidas em LUAD-M e 26 em LUAD-F. Apesar de 98 DE-miRNAs serem compartilhados entre os conjuntos de dados estratificados por sexo, nenhuma via do KEGG enriquecida foi comum a ambos os grupos, indicando perfis funcionais distintos.

Entre as vias enriquecidas, as principais vias relacionadas ao câncer foram resumidas de acordo com sua relevância biológica para o LUAD e os principais processos funcionais identificados em cada conjunto de dados estratificado por sexo (Tabela 3). Os resultados completos do enriquecimento são apresentados nas Tabelas Suplementares S1 e S2.



Em LUAD-M, as principais vias incluíram glicólise/gliconeogênese, via das pentoses fosfato, proteoglicanos no câncer e sinalização por HIF-1, destacando processos associados à adaptação metabólica, à regulação da matriz extracelular e à hipóxia. Em LUAD-F, as principais vias incluíram sinalização Wnt, proteólise mediada por ubiquitina, adesão focal e sinalização por NF-kappa B, envolvendo sinalização celular, regulação proteica, interações célula-matriz e respostas inflamatórias.

Tabela 3. Resumo das principais vias enriquecidas identificadas em LUAD-M e LUAD-F.

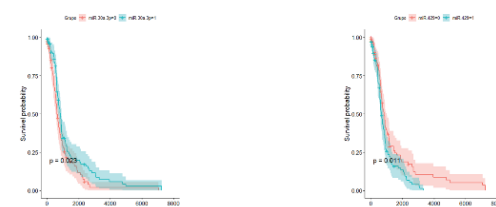
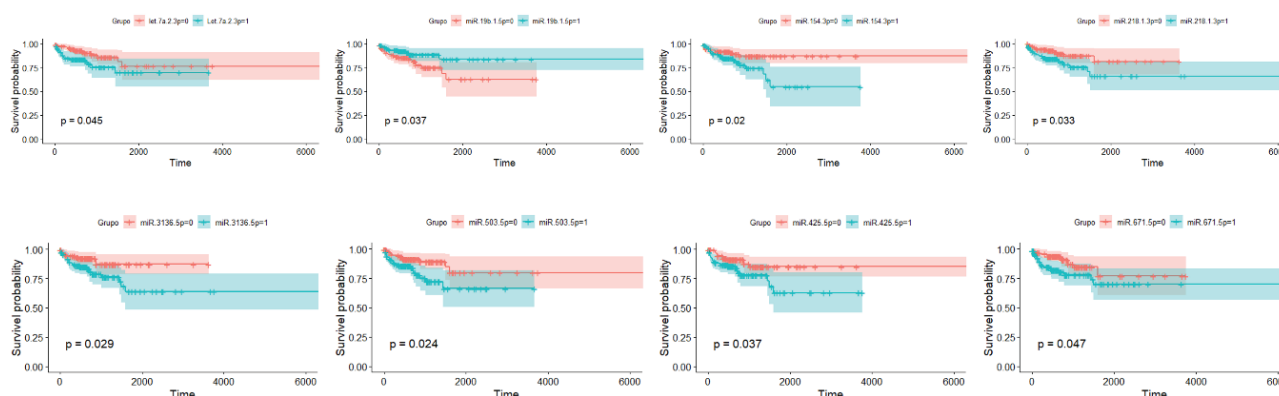
Conjunto de dados estratificado por sexo	Via enriquecida representativa	miRNAs observados	Valor de p	Principal processo biológico
LUAD-M	Glicólise / Gliconeogênese	48	0,012	Metabolismo tumoral
LUAD-M	Via das pentoses fosfato	24	0,018	Adaptação metabólica
LUAD-M	Proteoglicanos no câncer	95	0,020	Matriz extracelular
LUAD-M	Via de sinalização HIF-1	86	0,032	Hipóxia e angiogênese
LUAD-F	Via de sinalização Wnt	148	0,007	Crescimento e sinalização celular
LUAD-F	Proteólise mediada por ubiquitina	141	0,011	Regulação proteica
LUAD-F	Adesão focal	163	0,037	Interação célula-matriz
LUAD-F	Via de sinalização NF-kappa B	124	0,047	Inflamação e sobrevivência

A análise de sobrevida identificou diferentes DE-miRNAs associados aos desfechos dos pacientes nos conjuntos de dados estratificados por sexo (Tabela 4). Em LUAD-M, miR-30a-3p ($p = 0,023$) e miR-429 ($p = 0,011$) apresentaram diferenças significativas entre os grupos de expressão (Figura 2A). Maior expressão de miR-30a-3p foi associada a uma probabilidade de sobrevida ligeiramente maior, enquanto menor expressão de miR-429 foi associada a maior probabilidade de sobrevida.

Em LUAD-F, oito DE-miRNAs apresentaram associação significativa com a sobrevida: let-7a-2-3p ($p = 0,045$), miR-19b-1-5p ($p = 0,037$), miR-154-3p ($p = 0,020$), miR-218-1-5p ($p = 0,033$), miR-3136-5p ($p = 0,029$), miR-503-5p ($p = 0,024$), miR-425-5p ($p = 0,037$) e miR-671-5p ($p = 0,047$) (Figura 2B). Maiores probabilidades de sobrevida foram observadas nos grupos de baixa expressão para sete dos oito miRNAs, enquanto miR-19b-1-5p apresentou o padrão oposto.

**Tabela 4.** DE-miRNAs significativamente associados aos desfechos de sobrevida de acordo com o sexo.

Conjunto de dados	miRNA	Valor de p (log-rank)	Grupo de expressão com maior probabilidade de sobrevida
LUAD-M	miR-30a-3p	0,023	Alta expressão
LUAD-M	miR-429	0,011	Baixa expressão
LUAD-F	let-7a-2-3p	0,045	Baixa expressão
LUAD-F	miR-19b-1-5p	0,037	Alta expressão
LUAD-F	miR-154-3p	0,020	Baixa expressão
LUAD-F	miR-218-1-5p	0,033	Baixa expressão
LUAD-F	miR-3136-5p	0,029	Baixa expressão
LUAD-F	miR-503-5p	0,024	Baixa expressão
LUAD-F	miR-425-5p	0,037	Baixa expressão
LUAD-F	miR-671-5p	0,047	Baixa expressão

A. LUAD-M**B. LUAD-F****Figura 2.** Curvas de Kaplan–Meier mostrando os DE-miRNAs específicos de cada sexo significativamente associados à sobrevida em LUAD-M (A) e LUAD-F (B). Fonte: Elaborada pelos autores (2026).

DISCUSSÃO

Este estudo exploratório demonstrou que análises estratificadas por sexo revelam padrões moleculares distintos no LUAD. Embora diversos miRNAs diferencialmente expressos tenham sido compartilhados entre pacientes do sexo masculino e feminino, os miRNAs associados à sobrevida e as vias biológicas enriquecidas diferiram substancialmente entre os grupos. Esses achados reforçam a importância de considerar o sexo biológico na identificação de biomarcadores moleculares e estão de acordo com evidências que descrevem diferenças relacionadas ao sexo envolvendo alterações genéticas, expressão gênica, características imunológicas e redes regulatórias no LUAD (Li et al., 2023; Saha et al., 2024). Além disso, modelos transcriptômicos específicos para cada sexo apresentaram desempenho superior às abordagens independentes do sexo na

identificação de biomarcadores para o câncer de pulmão em estágio inicial (Liu et al., 2021). Portanto, o maior número de DE-miRNAs específicos do sexo feminino identificado neste estudo não deve ser interpretado como evidência de maior complexidade molecular, mas como um indicativo de diferenças nos padrões regulatórios relacionados ao sexo, conforme sintetizado na Figura 3.

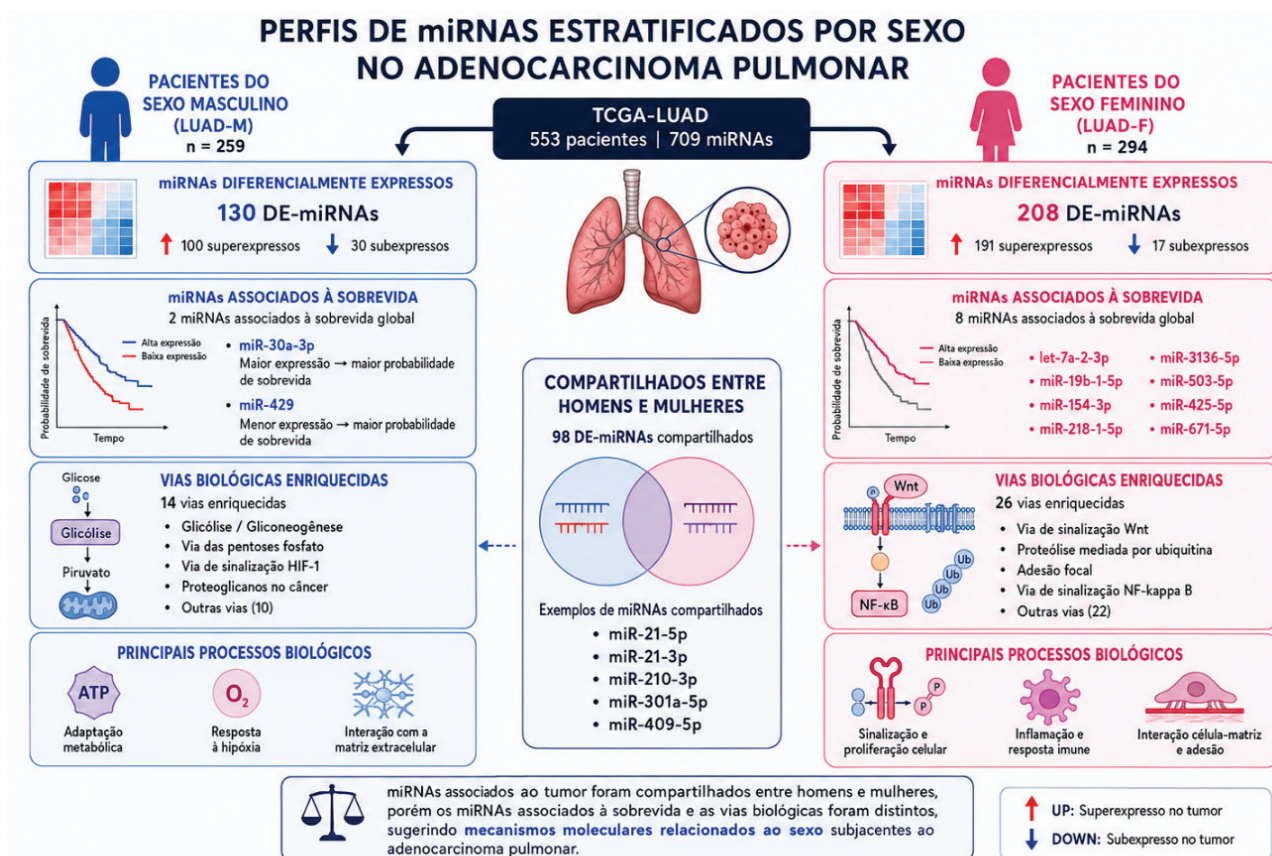


Figura. Resumo gráfico dos perfis de miRNAs estratificados por sexo no adenocarcinoma pulmonar (LUAD). São apresentados os miRNAs diferencialmente expressos (DE-miRNAs), os miRNAs associados à sobrevida e as principais vias biológicas enriquecidas identificadas em pacientes do sexo masculino (LUAD-M) e feminino (LUAD-F).

Figura 3. Resumo gráfico dos perfis de miRNAs estratificados por sexo no adenocarcinoma pulmonar. São apresentados os miRNAs diferencialmente expressos, os miRNAs associados à sobrevida e as principais vias biológicas enriquecidas para LUAD-M e LUAD-F. Fonte: Elaborada pelos autores com o auxílio do ChatGPT (OpenAI) para a elaboração da ilustração gráfica.

Entre os DE-miRNAs com menores valores de p, miR-21-5p, miR-21-3p, miR-210-3p, miR-301a-5p e miR-409-5p foram compartilhados entre LUAD-M e LUAD-F, sugerindo a participação de mecanismos regulatórios comuns na biologia do LUAD. No presente estudo, miR-21-5p e miR-21-3p apresentaram superexpressão em ambos os sexos. Evidências anteriores demonstram que o miR-21 promove a progressão do NSCLC por meio da regulação de genes como PTEN e SMAD7 e está associado à pior sobrevida em LUAD, reforçando sua plausibilidade biológica como uma importante biomarcador molecular candidato (Zhang et al., 2010; Tang et al., 2021; Qin e Zhang, 2025).

Apesar da sobreposição de DE-miRNAs individuais, nenhuma via enriquecida do KEGG foi comum entre LUAD-M e LUAD-F. Esse resultado é biologicamente plausível, uma vez que um mesmo miRNA pode regular múltiplos genes-alvo e participar de diferentes contextos regulatórios. Assim, a sobreposição parcial na expressão dos miRNAs não implica necessariamente consequências funcionais equivalentes. Estudos recentes também sugerem que diferenças relacionadas ao sexo no LUAD

emergem principalmente no nível das redes regulatórias (Saha et al., 2024). Da mesma forma, Patel et al. (2024) identificaram padrões de metilação do DNA específicos para cada sexo associados à expressão gênica e a biomarcadores imunológicos em tumores pulmonares do TCGA, sustentando o conceito de arquiteturas regulatórias distintas.

Em LUAD-M, as vias enriquecidas incluíram glicólise/gliconeogênese, via das pentoses fosfato, proteoglicanos no câncer e sinalização por HIF-1. Em conjunto, essas vias estão relacionadas à reprogramação metabólica, adaptação à hipóxia e interações entre o tumor e o microambiente tumoral, processos amplamente reconhecidos na progressão do câncer (Pezzuto and Carico, 2018; Izzo and Sanderson, 2011). Entretanto, como a análise de enriquecimento indica apenas sobre-representação estatística, essas interpretações devem ser consideradas geradoras de hipóteses.

Em LUAD-F, observou-se enriquecimento de vias relacionadas à sinalização Wnt, proteólise mediada por ubiquitina, adesão focal e sinalização por NF-kappa B. Essas vias estão envolvidas em processos como proliferação celular, regulação proteica, respostas inflamatórias e interação entre células e matriz extracelular (Teo and Kahn, 2010; Provenzano and Keely, 2009; Hayden et al., 2006). Esses resultados sugerem um perfil regulatório distinto no conjunto feminino, sem indicar que tais vias estejam exclusivamente ativas nesse grupo.

A análise de sobrevida estratificada por sexo revelou perfis distintos. Em LUAD-M, miR-30a-3p e miR-429 apresentaram associação significativa com a sobrevida. Evidências experimentais sugerem que o miR-30a-3p suprime a progressão do câncer de pulmão por meio da regulação de DNMT3A e da via p38 MAPK (Wei et al., 2019). No presente estudo, maior expressão desse miRNA esteve associada a maior probabilidade de sobrevida, resultado compatível com um possível papel supressor tumoral. Entretanto, essa associação foi baseada em análises de Kaplan–Meier e teste de log-rank, não devendo ser interpretada como evidência de efeito prognóstico independente.

Para o miR-429, menor expressão esteve associada a maior probabilidade de sobrevida em LUAD-M. Xie et al. (2015) demonstraram que variantes genéticas envolvendo o agrupamento miR-200b/miR-200a/miR-429 estavam associadas ao risco de NSCLC. Embora variantes genéticas e expressão de miRNAs representem níveis biológicos distintos, esses achados fornecem suporte adicional para a investigação desse agrupamento no câncer de pulmão. Os resultados do presente estudo ampliam essas evidências ao sugerirem uma associação estratificada por sexo com a sobrevida.

Em LUAD-F, oito miRNAs foram associados à sobrevida: let-7a-2-3p, miR-19b-1-5p, miR-154-3p, miR-218-1-5p, miR-3136-5p, miR-503-5p, miR-425-5p e miR-671-5p. Para sete deles, menor expressão esteve associada a maior probabilidade de sobrevida, enquanto miR-19b-1-5p apresentou o padrão oposto. A família let-7 está entre as mais bem estabelecidas no câncer de pulmão e participa da regulação de importantes vias oncogênicas (Yanaihara et al., 2006), reforçando a relevância biológica da associação observada para let-7a-2-3p.

A identificação do miR-3136-5p também merece destaque. Estudos anteriores associaram esse miRNA à sobrevida em LUAD e sugeriram sua participação no crescimento tumoral. No presente estudo, menor expressão esteve associada a maior probabilidade de sobrevida em pacientes do sexo feminino. Esse resultado reforça que a função biológica dos miRNAs depende do contexto molecular, incluindo tecido, disponibilidade de genes-alvo e, potencialmente, mecanismos regulatórios relacionados ao sexo, devendo ser interpretado como uma associação e não como demonstração de causalidade.

Uma observação importante foi o desequilíbrio entre o número de miRNAs associados à sobrevida em LUAD-M (dois) e LUAD-F (oito). Essa diferença pode refletir estruturas regulatórias distintas, mas também pode decorrer de diferenças na frequência de eventos, tempo de acompanhamento, heterogeneidade clínica ou poder estatístico entre os grupos. Portanto, esse resultado reforça a importância de delineamentos analíticos estratificados por sexo e da validação independente dos achados.

De forma integrada, os resultados sugerem que a heterogeneidade relacionada ao sexo no LUAD envolve tanto miRNAs compartilhados entre homens e mulheres quanto diferentes contextos regulatórios. A superexpressão compartilhada de miRNAs como miR-21-5p e miR-210-3p pode refletir mecanismos comuns da biologia tumoral, enquanto os distintos perfis de enriquecimento funcional e os diferentes miRNAs associados à sobrevida sugerem que seus efeitos biológicos podem variar entre os sexos. Essa interpretação é consistente com estudos que descrevem diferenças genéticas, transcriptômicas, imunológicas e de redes regulatórias relacionadas ao sexo no LUAD (Li et al., 2023; Saha et al., 2024).

As possíveis implicações clínicas desses achados devem ser interpretadas com cautela. Os miRNAs identificados não constituem biomarcadores clinicamente validados; entretanto, os resultados sugerem que análises realizadas em populações combinadas podem deixar de identificar associações específicas de cada sexo. Após validação em coortes independentes, perfis de miRNAs estratificados por sexo poderão ser investigados como características moleculares complementares em estudos prognósticos. De forma semelhante, as diferentes vias enriquecidas podem orientar futuros estudos mecanísticos destinados a investigar como diferenças regulatórias relacionadas ao sexo contribuem para a heterogeneidade do LUAD.

Diversas limitações devem ser consideradas. Este estudo retrospectivo e exploratório foi baseado exclusivamente em dados do TCGA-LUAD, sem validação em coorte externa. Foram utilizados dados processados do TCGA/GDC, sem controle adicional das leituras brutas ou correção para possíveis efeitos de lote. As análises de sobrevida utilizaram a mediana da expressão como ponto de corte e basearam-se em curvas de Kaplan–Meier e teste de log-rank, não estabelecendo valor prognóstico independente. Além disso, potenciais fatores de confusão clínicos não foram incorporados a modelos multivariados de Cox. A utilização de uma única coorte e a ausência de correção para múltiplas comparações nas análises exploratórias de sobrevida podem aumentar a probabilidade de resultados falso-positivos. Finalmente, o enriquecimento funcional indica apenas sobre-representação estatística de vias biológicas, não demonstrando sua ativação direta, e não foi realizada validação experimental dos miRNAs identificados.

Estudos futuros deverão validar esses resultados em coortes independentes, preferencialmente multicêntricas, mantendo a estratificação por sexo. Modelos multivariados de Cox, validação externa dos pontos de corte e análises integrativas envolvendo mRNAs, alterações genômicas, metilação do DNA, perfis imunológicos e fatores hormonais poderão esclarecer melhor os mecanismos regulatórios relacionados ao sexo. Além disso, experimentos funcionais deverão investigar especialmente os papéis de miR-30a-3p, miR-429 e dos miRNAs associados à sobrevida em LUAD-F. Estudos recentes que combinam abordagens moleculares, clínicas e de célula única ilustram a importância dessa validação em múltiplos níveis.

Em síntese, este estudo identificou diferenças estratificadas por sexo na expressão de miRNAs, nas associações com a sobrevida e nas vias biológicas enriquecidas em LUAD. Os resultados sugerem a coexistência de miRNAs associados ao tumor compartilhados entre os sexos e de perfis regulatórios



distintos relacionados ao sexo. Embora não estabeleçam biomarcadores clinicamente aplicáveis, esses achados fornecem uma base para a geração de hipóteses em futuras investigações sobre o papel do sexo biológico como variável relevante em pesquisas sobre LUAD baseadas em miRNAs.

CONCLUSÃO

Este estudo exploratório demonstrou que análises estratificadas por sexo revelam perfis distintos de expressão de miRNAs, miRNAs associados à sobrevida e vias biológicas enriquecidas no adenocarcinoma pulmonar. Embora diversos miRNAs tenham sido compartilhados entre pacientes do sexo masculino e feminino, as diferenças observadas nas associações com a sobrevida e no enriquecimento funcional sugerem que o sexo biológico influencia o panorama molecular do LUAD. Esses achados reforçam a importância da inclusão do sexo como uma variável biológica relevante em estudos baseados em miRNAs e fornecem uma base para a geração de hipóteses em futuras investigações. A validação em coortes independentes, a realização de análises prognósticas multivariadas e estudos experimentais serão essenciais para determinar a relevância biológica e clínica dos miRNAs e das vias identificadas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil (Código de Financiamento 001). PROGRAD/PROPP/PROEC/ACI/AUIN, Edital UNESP PRESENTE – Investimento proveniente do retorno do programa: apoio financeiro aos estudantes da UNESP.

DECLARAÇÃO SOBRE O USO IA

Não foi apresentada declaração específica sobre o uso de ferramentas de inteligência artificial na preparação deste manuscrito. A responsabilidade pela exatidão, integridade, originalidade e conteúdo integral do artigo, inclusive por materiais eventualmente produzidos ou revisados com auxílio de ferramentas de inteligência artificial, permanece exclusivamente com os autores.

REFERENCES

- Aparicio-Puerta, E., Hirsch, P., Schmartz, G. P., Kern, F., Fehlmann, T., & Keller, A. (2023). miEAA 2023: Updates, new functional microRNA sets and improved enrichment visualizations. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W319–W325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad392>
- Caserta, S., Manca, P., Rinaldi, L., Mazzoni, F., De Summa, S., & Tommasi, S. (2023). Gender differences and miRNAs expression in cancer: Implications on prognosis and susceptibility. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11544. <https://doi.org/10.3390/ijms241411544>
- da Rocha Camargo, B., de Souza, V. D. G. P., Lapa, R. M. L., dos Reis, P. P., & Oliveira, R. A. (2023). A decision tree-based classifier compares three data analysis methods for the identification of miRNAs associated with early-stage lung cancer. *Revista Foco*, 16(5), e2031. <https://doi.org/10.54751/revistafoco.v16n5-084>



- Fu, Y., Liu, J., Chen, Y., Liu, Z., Xia, H., & Xu, H. (2023). Gender disparities in lung cancer incidence in the United States during 2001–2019. *Scientific Reports*, 13, 12581. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39440-8>
- Gagolewski, M. (2022). stringi: Fast and portable character string processing in R. *Journal of Statistical Software*, 103(2), 1–59. <https://doi.org/10.18637/jss.v103.i02>
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*, 32(Suppl. 1), D109–D111. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh023>
- Haranguş, A., Munteanu, R., Ciocan-Cârjă, O., Berindan-Neagoe, I., & Braicu, C. (2022). Identification of potential microRNA panels for male non-small cell lung cancer identification using microarray datasets and bioinformatics methods. *Journal of Personalized Medicine*, 12(12), 2056. <https://doi.org/10.3390/jpm12122056>
- Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF- κ B and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758–6780. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209943>
- Imielinski, M., Berger, A. H., Hammerman, P. S., Hernandez, B., Pugh, T. J., Hodis, E., ... Meyerson, M. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*, 150(6), 1107–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
- Iozzo, R. V., & Sanderson, R. D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(5), 1013–1031. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x>
- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*, 6(6), 590–610. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.006>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457–481. <https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452>
- Kassambara, A., Kosinski, M., & Biecek, P. (2021). *survminer: Drawing survival curves using "ggplot2"* (R package version 0.4.9). <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
- Li, X., Wei, S., Deng, L., Tao, H., Liu, M., Zhao, Z., Du, X., Li, Y., & Hou, J. (2023). Sex-biased molecular differences in lung adenocarcinoma are ethnic and smoking specific. *BMC Pulmonary Medicine*, 23, 99. <https://doi.org/10.1186/s12890-023-02387-7>
- Liu, Q., Wang, Y., Duan, M., Fan, Y., Pan, X., Liu, S., Yu, Q., Huang, L., & Zhou, F. (2021). Females and males show differences in early-stage transcriptomic biomarkers of lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. *Diagnostics*, 11(2), 347. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020347>
- Lopes-Ramos, C. M., Quackenbush, J., & DeMeo, D. L. (2020). Genome-wide sex and gender differences in cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 597788. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.597788>
- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, 50(3), 163–170.
- May, L., Bonomi, M., Fidler, M. J., Borgia, J. A., & Bonomi, P. (2023). Sex differences in lung cancer. *Cancers*, 15(12), 3111. <https://doi.org/10.3390/cancers15123111>
- Myers, D. J., & Wallen, J. M. (2022). Lung adenocarcinoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/>
- Patel, D., McElroy, J. P., Weng, D. Y., Sahar, K., Reisinger, S. A., Freudenheim, J. L., Wewers, M. D., Shields, P. G., & Song, M.-A. (2024). Sex-related DNA methylation is associated with inflammation and gene expression in the lungs of healthy individuals. *Scientific Reports*, 14, 14280. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65027-y>
- Pezzuto, A., & Carico, E. (2018). Role of HIF-1 in cancer progression: Novel insights. A review. *Current Molecular Medicine*, 18(6), 343–351. <https://doi.org/10.2174/1566524018666181109121849>



- Poleri, C. (2022). Sex-based differences in lung cancer: Does it matter? *Journal of Thoracic Oncology*, 17(5), 599–601. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.03.002>
- Provenzano, P. P., & Keely, P. J. (2009). The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell Adhesion & Migration*, 3(4), 347–350. <https://doi.org/10.4161/cam.3.4.9458>
- Qin, T., & Zhang, G. (2025). The role of miR-21 in early-stage lung adenocarcinoma: Clinical and bioinformatics insights. *Scientific Reports*, 15, 37903. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-21742-8>
- Ragavan, M., & Patel, M. I. (2022). The evolving landscape of sex-based differences in lung cancer: A distinct disease in women. *European Respiratory Review*, 31(163), 210100. <https://doi.org/10.1183/16000617.0100-2021>
- Saha, E., Ben Guebila, M., Fanfani, V., Fischer, J., Shutta, K. H., Mandros, P., DeMeo, D. L., Quackenbush, J., & Lopes-Ramos, C. M. (2024). Gene regulatory networks reveal sex difference in lung adenocarcinoma. *Biology of Sex Differences*, 15, 62. <https://doi.org/10.1186/s13293-024-00634-y>
- Stabellini, N., Bruno, D. S., Gubens, M. A., Padda, S. K., & Bunn, P. A. (2022). Sex differences in lung cancer treatment and outcomes at a large hybrid academic-community practice. *JTO Clinical and Research Reports*, 3(4), 100307. <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2022.100307>
- Tang, J., Li, X., Cheng, T., & Wu, J. (2021). miR-21-5p/SMAD7 axis promotes the progress of lung cancer. *Thoracic Cancer*, 12(17), 2307–2313. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14060>
- Teo, J.-L., & Kahn, M. (2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(12), 1149–1155. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.012>
- The Cancer Genome Atlas. (2018). *Genomic Data Commons Data Portal*. <https://portal.gdc.cancer.gov/>
- Therneau, T. M. (2022). *A package for survival analysis in R* (R package version 3.4-0). <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
- Wei, D., Yu, G., & Zhao, Y. (2019). MicroRNA-30a-3p inhibits the progression of lung cancer via the PI3K/AKT by targeting DNA methyltransferase 3a. *Oncotargets and Therapy*, 12, 7015–7024. <https://doi.org/10.2147/OTT.S213583>
- Weisstein, E. W. (2004). Bonferroni correction. *Wolfram MathWorld*. <https://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>
- Xie, K., Chen, M., Wang, C., Yu, D., Lu, Y., Wang, C., ... Shen, H. (2015). A functional variant in miR-155 regulation region contributes to lung cancer risk and survival. *Oncotarget*, 6(40), 42781–42792. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5840>
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., ... Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9(3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>
- Zhang, J.-G., Wang, J.-J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., & Yang, G.-H. (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica Chimica Acta*, 411(11–12), 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.02.074>

**Tabela Suplementar S1.** Lista completa das vias do KEGG enriquecidas em LUAD-M.

KEGG pathway	Observed*	p-value
Glycolysis / Gluconeogenesis	48	0.012
Other types of O-glycan biosynthesis	34	0.014
Pentose phosphate pathway	24	0.018
Proteoglycans in cancer	95	0.020
Apelin signaling pathway	82	0.024
Protein processing in the endoplasmic reticulum	97	0.026
Pathways in cancer	117	0.029
B cell receptor signaling pathway	65	0.031
HIF-1 signaling pathway	86	0.032
Pyruvate metabolism	39	0.032
Cytokine–cytokine receptor interaction	88	0.039
Colorectal cancer	88	0.041
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3	0.047
Primary immunodeficiency	22	0.048

*Observed: Number of miRNAs enriched in the pathway.

**Tabela Suplementar S2.** Lista completa das vias do KEGG enriquecidas em LUAD-F.

KEGG pathways	Observed*	p-value
Basal cell carcinoma	102	0.002
Axon guidance	149	0.006
Wnt signaling pathway	148	0.007
Alcoholic liver disease	137	0.007
Ubiquitin-mediated proteolysis	141	0.011
Tight junction	142	0.012
Virion – Adenovirus	8	0.015
Pancreatic câncer	150	0.020
Basic transcription factors	48	0.023
Inositol phosphate metabolismo	97	0.026
Cushing syndrome	154	0.027
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	6	0.028
Gastric câncer	157	0.028
Translation of flavor	38	0.033
Taurine and hypotaurine metabolismo	8	0.034
Focal adhesion	163	0.037
Virion – Lyssavirus	7	0.038
Longevity regulating pathway – multiple species	136	0.038
Thyroid hormone synthesis	90	0.038
Sulfur relay system	18	0.040
C-type lectin receptor signaling pathway	128	0.041
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	151	0.043
NF-kappa B signaling pathway	124	0.047
Insulin resistance	142	0.047
Alcoholism	145	0.048
Glycosaminoglycan degradation	28	0.049

*Number of miRNAs enriched in the pathway