

# ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DO NICHOS PRÉ-METASTÁTICO DO CÂNCER DE BOCA

Ana Kelly da Silva Fernandes Duarte<sup>1</sup>, Ana Cláudia da Silva Fernandes Duarte<sup>2</sup>,  
Heloísa de Almeida Freitas<sup>1</sup>, Carlos Alberto de Carvalho Fraga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Arapiraca, Brasil  
(anakellyduarte123@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Ciências da Saúde (UNCISAL), Maceió, Brasil

**Resumo:** Os tumores primários são capazes de modificar um microambiente distante do seu sítio primário, para criar o que é conhecido como nicho pré-metastático (NPM). No entanto, os mecanismos moleculares que estão associados ao NPM e a progressão do câncer bucal permanecem desconhecidos. Dessa maneira, foi realizada uma análise de bioinformática para identificar os mecanismos moleculares envolvidos nessas interações, e foi identificada a ação de vários eventos bioquímicos e moleculares.

**Palavras-chave:** Carcinoma; Matriz Extracelular; Metástase.

## INTRODUÇÃO

Stephen Paget sugeriu que as células neoplásicas circulantes no sangue seriam como uma “semente” metastática que possuem a capacidade de colonizar um “solo” microambiental de órgãos secundários ao tumor. No entanto, chegar a outro local no corpo não garante a formação de um tumor metastático, a colonização e proliferação bem sucedida de células mutadas depende da interação dessas células com o microambiente local. Estudos posteriores sugeriram que os tumores primários são capazes de modificar um microambiente distante da localidade do tumor primário antes da chegada de células mutadas metastáticas, para criar o que é conhecido como o nicho pré-metastático. (KAPLAN, et al. 2005).

O nicho metastático corresponde a um microambiente que sustentam o crescimento dessas células neoplásicas disseminadas na circulação sanguínea e que estão colonizando outros órgãos. Desse modo, é importante citar alguns agentes que propiciam as relações entre as células neoplásicas e o microambiente que elas irão se estabelecer, entre elas estão: as células estromais, as células derivadas da medula óssea e citocinas, também são apontadas como um dos fatores importante para a formação do nicho pré-metastático, o VEGF-A e PlGF.

Entretanto as modificações moleculares que ocorrem no carcinoma epidermoide de boca para uma futura disseminação metastática e uma posterior colonização, mesmo antes da chegada das células

mutadas em seu sítio secundários ainda são pouco debatidas, assim, com essa análise de bioinformática pretende-se localizar eventos bioquímicos e moleculares que estejam associados à essas modificações.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de dados GEO

O banco de dados Gene expression omnibus (GEO) [[www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)] é uma das principais plataformas de armazenamento e distribuição de dados de expressão gênica gerados através da tecnologia de microarray disponível na web, público e gratuito. Foi a partir dessa plataforma que perfis de expressão gênica foram gerados, com referências GSE2280 para tecidos tumorais e GSE70604 para tecidos de linfonodos normais e foram gerados. O GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) é uma ferramenta web interativa que pode analisar qualquer série de dados gerada no GEO, ela também serve para comparar dois perfis de expressão gênica para as mesmas células ou tecidos, como a condições de controle e a experimental, onde a condição experimental pode ser uma doença, perturbação farmacológica ou perturbação genética (superexpressão, mutação, knockdown ou knockout). GEO2R foi aplicado para rastrear mRNAs diferencialmente expressos entre tecidos que

apresentavam características de um nicho pré-metastático e amostras de tecidos normais.

### **Análise de enriquecimento funcional e por via**

A partir das listas de genes obtidos, foi possível fazer uma análise Gene ontology (GO) de processos biológicos relevantes, tais como componentes celulares e funções moleculares, todo o procedimento foi realizado através do programa Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER, [www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) um banco de dados de famílias de proteínas, que indica suas funções e respectivas vias. Os genes identificados foram classificados de acordo com a sua função. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) é um recurso de banco de dados integrado para interpretação biológica de sequências genômicas e outros dados moleculares. As análises do KEGG estavam disponíveis na plataforma Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), que funciona como um armazenamento de dados que têm como objetivo central extrair informações biológicas significativas como as funções e vias de genes e proteínas. As análises KEGG foram realizadas usando a plataforma DAVID para identificar na análise bioinformática de genes diferencialmente expressos (DEGs).

### **Identificação de metabólitos associados a nicho pré-metastático**

Para identificar os metabólitos em torno das alterações transcricionais significativas do nicho pré-metastático, mudanças estatisticamente significativas nos perfis de expressão gênica GEO foram mapeadas no the Human Metabolic Reaction (HMR 2.0), através do algoritmo de metabólitos repórter implementado na BioMet Toolbox (v2.0)]. Os valores p que representam a significância dos metabólitos foram corrigidos pelo método de Benjamini-Hochberg e os metabólitos repórteres com um valor de p ajustado  $<0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. A sobre-representação de metabólitos repórter nas vias metabólicas foi determinada usando as anotações de percurso apresentadas pelo banco de dados Metabolites Biological Role (MBRole) (v2.0).

### **Dados de RNA-seq e dados clínicos TCGA**

Para confirmar a primeira análise no GEO2R utilizamos o TCGAbiolinks em R/Bioconductor (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/TCGAbiolinks.html>) (Colaprico et al., 2016) e o TCGAbiolinksGUI (Silva et al., 2016) para realizar o download de dados genômicos e clínicos de tecidos normais, tumorais e em metástase.

### **Análise estatística.**

Para determinar se os genes eram estatisticamente significativos em nível de função foram utilizados os valores  $P < 0,05$  para corrigir a ocorrência de resultados falso-positivos indicar diferença significativa, e o valor de  $\log_{2}FC \geq 1$  definidos como critério de corte.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A fim de avaliar fatores imprescindíveis para o desenvolvimento e progressão do nicho pré-metastático de câncer de cabeça e pescoço, organizamos em grupos os dados moleculares obtidos no GEO (GSE2280) foram eles, tumor sem metástase e tumor com metástase, linfonodo normal, linfonodo com metástase.

Na análise Gene Ontology (GO), mais especificamente com a plataforma DAVID observamos e identificamos as funções dos DEGs envolvidos com a metástase do câncer de cabeça e pescoço para os linfonodos. Fatores aumentados e diminuídos expressos em tecidos com apenas o tumor, a plataforma gerou termos como “moléculas de adesão” para aumentados e “metabolismo de ácidos” (araquidônico, retinóico e linoleico) para diminuídos. Fatores expressos em tumores com metástase resultados designaram termos como “replicação”, “reparo do DNA”, como aumentados. Fatores aumentados e diminuídos expressos em tecidos linfonodais normais “ECM-receptor interação (Matriz extracelular)”, “adesão focal, ” “pathways in cancer”, “adhesions junction” e diminuídas “respostas imunológicas”.

Os dados obtidos nesse estudo estão de acordo com as pesquisas bibliográficas realizadas, a superexpressão da ECM (Matriz extracelular) esta sendo associada ao câncer e a disseminação metastática em diversas pesquisas, favorecendo o surgimento de um microambiente tumorigênico. (LU, et al. 2012). A matriz extracelular refere-se a vários tipos de macromoléculas (proteoglicanos e glicosaminoglicanas), proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e glicoproteínas adesivas (laminina, tenascina e fibronectina) que possui função estrutural. (PEREIRA, et al. 2005). Através da degradação da MEC por ação de enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases (MMPs), que podem ser produzidas tanto pelo estroma tumoral como pelas próprias células neoplásicas, as quais podem interferir no processo de adesão célula-célula, através da degradação da E-caderina, assim as células malignas teriam um maior potencial invasivo (YVES et al. 2004).

Após o rompimento da MEC as suas proteínas atuam como reguladores para a colonização de células mutadas, auxiliando no fornecimento de um microambiente ideal para a

adesão e crescimento no nicho pré-metastático. Proteínas advindas da matriz extracelular como o colágeno IV e a fibronectina foram encontradas em um microambiente antes da chegada das células mutadas, ambas proteínas foram utilizadas para aumentar as células neoplásicas, promovendo uma colonização metastática. Além disso, em tecidos normais a ECM atua como mecanotransdutor, traduzindo sinais celulares que determinam o comportamento celular (AGUADO et al. 2016).

Para uma colonização metastática bem sucedida, as células neoplásicas precisam desenvolver um perfil genético específico que aumente a formação de metástases, e modificar o microambiente local nos órgãos-alvo secundários, desse modo, as células mutadas secretam VEGF-A, TGF $\beta$  e TNF $\alpha$  que, em por sua vez, induzem a expressão das proteínas S100A8 e S100A9 para propiciar a formação do nicho pré-metastático (RAFII et al. 2006).

O complexo de adesão focal, irá consistir de proteínas integrin, um multicomplexo de adaptadores e proteínas sinalizadoras, sendo interpretadas como um mecanossensor que irá realizar uma ligação entre o citoesqueleto de actomiosina com a matriz extracelular (ECM). Mudanças nas funções ou expressão das moléculas de adesão podem comprovar um desenvolvimento em relação ao tumor, afetando a sinalização celular. Por outro lado, as moléculas de sinalização podem afetar diretamente as mudanças da adesão, consequentemente, as interações célula-célula e célula-matriz. Muitos componentes da adesão focal sofrem alterações que transmitem resultados funcionais em reposta a força aplicada. (SAWADA et al. 2006 ; DEL RIO et al. 2009 ; WANG et al. 2011).

As proteínas MAPKs estão intimamente ligadas vias de transdução de sinal uma vez que são consideradas vias de sinalização, elas regulam múltiplas funções celulares, como a proliferação e diferenciação celular, juntamente com a produção de citocinas e apoptose. (DUMITRU, et al. 2011) no HNC (Câncer de cabeça e pescoço) a MAPKs irá induzir a fosforilação de CREB (um regulador crítico da célula em sua diferenciação, proliferação e sobrevivência no sistema nervoso) e da p27 via p38-MAPK, fornecendo evidências de que o p38-MAPK é um ativador a montante de p 27 através da fosforilação em T198 e CREB na ativação de neutrófilos induzidas pela HNC demonstrando assim, um papel fundamental da p27 para a diferenciação de neutrófilos. (DUMITRU, et al. 2011).

Estudos revelaram que os neutrófilos representam a principal população de células envolvidas na formação de nicho pré-metastático. Essas células são recrutadas por Bv8, MMP-9,

S100A8 e S100A9 (HIRATSUKA et al. 2008) a via de quimiocina mais estudada no neutrófilo é o eixo CXCR4 / CXCL12 (JABLONSKA et al. 2010). Sítios pré-metastáticos como pulmões, ossos, fígado, cérebro e gânglios linfáticos apresentam altos níveis de CXCL12, e consequentemente após a inibição in vivo de CXCR4 / as interações com CXCL12 reduziram significativamente a metástase de células neoplásicas da mama para o nódulo linfático e para os pulmões (MULLER et al. 2001).

Com relação a baixa expressão do metabolismo dos ácidos retinóicos araquidônico e linoleico estes estariam diminuídos devido ao fato de possuírem propriedades antineoplásicas. A ativação transcricional do receptor nuclear RAR pelo ácido retinóico (AR), é frequentemente a sinalização mais prejudicada durante a tumorigênese ( FAVORSKAYA et al. 2014). A proteína 2 de ligação ao ácido retinóico celular (CRABP2) pertence a uma família de pequenos citosólicos, são proteínas de ligação e portadores específicos de vitamina A, (YUAN, et al. 2013). sua formação acontece a partir da recombinação do AR para facilitar suas atividades transcricionais (SCHUG et al. 2008). A CRABP2, é utilizada em varios estudos como biomarcador. sua presença é identificada em um grande número de carcinomas, como por exemplo, no câncer de próstata (OKUDUCU et al. 2005), nos tumores de cabeça e pescoço, retinoblastoma primário e câncer de pulmão (CALMON et al. 2009). A CRABP2 é regulada negativamente em tecidos tumorais pois inibe notavelmente o crescimento celular, induz morte celular apoptótica e promove a transição do ponto de verificação G1 / S (YANG et al. 2016).

Para confirmar os dados outra análise foi realizada, com o auxílio da plataforma TCGAbiolinksGUI, termos como “moléculas de adesão” e “metabolismos de ácidos” foram gerados indicando que em tecidos de tumor esses fatores estariam presentes, já com relação a tumor com metástase os resultados gerados foram “replicação do DNA” “reparo do DNA”.

## CONCLUSÃO

Os dados obtidos através da análise de bioinformática estão de acordo com as bibliografias. Os fatores diminuídos em reposta a metástase/câncer normalmente são aqueles que possuem maior ligação com o sistema imunológico, sendo um dos principais afetados durante este processo, enquanto que os fatores aumentados são designados a desempenhar importantes papéis para a proliferação e estabelecimento das células neoplásicas em sítios distantes, dando início ao processo do nicho pré-metastático. Através desse estudo foi possível observar o importante papel de proteínas e lipídios, que sofreram alterações significativas, para o desenvolvimento do nicho pré-metastático.

## REFERÊNCIAS

- AGUADO, Brian A. et al. Extracellular matrix mediators of metastatic cell colonization characterized using scaffold mimics of the pre-metastatic niche. **Acta biomaterialia**, v. 33, p. 13-24, 2016.
- CALMON, Marilia F. et al. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, p. 1329-IN9, 2009.
- DUMITRU, Claudia A. et al. A novel p38-MAPK signaling axis modulates neutrophil biology in head and neck cancer. **Journal of leukocyte biology**, v. 91, p. 591-598, 2012.
- FAVORSKAYA, Irina et al. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 10, p. 10295-10300, 2014.
- HIRATSUKA, Sachie et al. The S100A8–serum amyloid A3–TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. **Nature cell biology**, v. 10, n. 11, p. 1349-1355, 2008.
- HONG SD et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncol.** v. 36, p. 207–213. 2000.
- HONG, Sung H. et al. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. **Cancer research**, v. 59, n. 9, p. 2223-2228, 1999.
- IA, Schug TT Berry DC Toshkov. Cheng L Nikitin AY Noy N 2008 Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. **PNAS**, v. 105, p. 7546-7551, 2008.
- JABLONSKA, Jadwiga et al. Neutrophils responsive to endogenous IFN- $\beta$  regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 4, p. 1151-1164, 2010.
- KAPLAN, Rosandra N. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 820-827, 2005.
- KARTHIK, L. et al. Protease inhibitors from marine actinobacteria as a potential source for antimalarial compound. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e90972, 2014.
- KOWANETZ, Marcin et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+ Ly6C+ granulocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 50, p. 21248-21255, 2010.
- MALLIKARJUNA, Kandam et al. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 4, n. 4, p. 449-463, 2010.
- MÜLLER, Anja et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-56, 2001.
- NAGARAJ, Srinivas et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. **Nature medicine**, v. 13, n. 7, p. 828-835, 2007.
- ONDREY, Frank G. Arachidonic acid metabolism: a primer for head and neck surgeons. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 20, n. 4, p. 334-349, 1998.
- OKUDUCU, Ali Fuat et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. **International journal of oncology**, v. 27, n. 5, p. 1273-1282, 2005.
- OWENS, Lewis V. et al. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. **Cancer research**, v. 55, n. 13, p. 2752-2755, 1995.
- PEREIRA, Antonio LA et al. The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 1, p. 81-86, 2005.
- RAFII, Shahin; LYDEN, David. S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches. **Nature cell biology**, v. 8, n. 12, p. 1321-1323, 2006.
- SCHUG, Thaddeus T. et al. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR $\beta/\delta$  to RAR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 21, p. 7546-7551, 2008.
- TAKADA, Tohru et al. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. **The Journal of Biochemistry**, v. 122, n. 2, p. 453-458, 1997.

THOMAS GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* v. 35, p. 227-33, 1999.

WU, Ching-Fang et al. The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. **International journal of cancer**, v. 137, n. 4, p. 837-847, 2015.

YAN, Hannah H. et al. Gr-1+ CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. **Cancer research**, v. 70, n. 15, p. 6139-6149, 2010.

YANG-YEN, Hsin-Fang et al. Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. **New Biol**, v. 3, n. 12, p. 1206-1219, 1991.

YANG, Qingyuan et al. Cellular retinoic acid binding protein 2 is strikingly downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148381, 2016.

YVES A. et al. Proteases, Extracellular matrix and cancer. **Am J of Pathol**; vol. 164, 2004.