

NÍVEL DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL EM TRATAMENTO COM RADIOTERAPIA

Autores: JULIA AQUINO DE MORAIS, JULIA AQUINO DE MORAIS, ELOÁ MANGABEIRA SANTOS, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, DANIELA FERNANDA DE FREITA, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

Introdução

Os tumores malignos apresentam um microambiente dinâmico suportado por componentes da matriz extra-celular. Estudos comprovam que o sistema imunológico pode promover desenvolvimento e progressão de neoplasias, e podem estar envolvidos na presença de infiltrados de neutrófilos em neoplasias para facilitar a metástase (WCULEK, SK et al. 2015). Recentemente, estudos descreveram a associação entre neutrófilos e a geração de redes extracelulares, como elemento central da resposta imune inata (PARK, J et al, 2016). Dessa forma, ocorre um processo onde as células cancerosas podem sequestrar os neutrófilos, para erradicar os agentes patogênicos através da formação de redes de neutrófilos extracelulares (NET)s, contudo, podem aumenta a capacidade dos mesmos a disseminação metástase (GARLEY, M et al. 2016). Portanto, O objetivo do estudo atual foi investigar os níveis de NETs em pacientes em radioterapia com Carcinoma de células escamosas oral (CCEO).

Material e métodos

A. Procedimentos de análise bioinformática

Inicialmente, foi realizada uma análise bioinformática específica de genes humanos para construir o mapa de interação proteína-proteínas. A versão de software STRING 10.0 foi utilizada. A rede obtida foi expandida uma vez e a pontuação combinada para cada gene foi ajustada multiplicando-se por 1000 para obter uma única pontuação, denominada número ponderado de links (WNL) (POSWAR, F de O et al. 2015). Todas as interações de um gene em toda a base de dados STRING foram somadas e ajustadas multiplicando por 1000 para obter o valor TIS (BRAGAZZI, NL et al. 2011). Os genes foram classificados de acordo com este parâmetro em grupos, pelo método de agrupamento K-means. As categorias com maior WNL e TIS foram escolhidas para identificar os genes que possuem mais interações.

B. Análise topológica e ontológica

Cytoscape foi utilizado para análise ontológica, e O aplicativo BinGO foi aplicado (BRAGAZZI, NL et al. 2011). E os resultados sugerem as vias moleculares envolvidas no processo.

C. Validação de análises de Bioinformática



Dez indivíduos saudáveis ??compreendiam o grupo controle. O sangue sérico de oito pacientes com CCEO foi coletado em dois momentos diferentes para avaliar os níveis de NETs, ??IL-6 e IL-8 durante o tratamento (radioterapia) RT. A RT foi fornecida em sistema fraccionado. No primeiro momento da coleta, eles receberam uma média de 30 Gy e a segunda vez após receberem 36 Gy.

D. Quantificação de Neutrófilos extra-celulares

Resumidamente, uma placa de fundo plano de 96 poços foi revestida com o anticorpo anti-MPO de alta afinidade (marcador NET), e a quantidade de DNA ligado à enzima foi quantificada. A intensidade de fluorescência, em relação ao DNA ligado a MPO, foi quantificada por um leitor de fluorescência

E. Determinação de citocinas

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram medidas por ELISA.

F. Declaração de ética

Os materiais biológicos e dados clínicos vieram do Banco Biológico Institucional Humano (CONEP: B-013) Todos os pacientes assinaram o consentimento informado. A aprovação ética para este estudo foi obtida junto do Conselho de Revisão Institucional (CAAE 62833516.7.0000.5146).

A. Análise estatística

As análises foram realizadas usando o SPSS realizado no SPS. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram conduzidos para avaliar a distribuição de dados. As amostras apresentaram distribuição normal. O significado estatístico foi aceito em $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Uma busca na consulta preliminar PUBMED retornou apenas dois genes (IL-6 e HIF1A). Em um segundo passo no GeneCards, foi sugerida uma lista de 11 potenciais genes. A rede final (Fig. 1A) foi representada pelo STRING e Cytoscape (5). Um diagrama de dispersão foi construído com base em interações de valores de WNL e TIS e até a regulação das proteínas para o fenômeno (Fig. 1B). Um número crescente de clusters indicou dois genes líderes (Fig. 1C). Interlequin 6 (IL6) e Interleukin 8 foram selecionados como alvo primário da NET (Fig. 1B). Além disso, os pacientes com OSCC apresentaram níveis séricos mais elevados de NETs (Fig.3A) em relação ao grupo controle. Do mesmo modo, os níveis de IL-6 e IL-8 aumentaram em pacientes com RT (Fig. 3B e C, respectivamente).

Foi observado em estudo com câncer renal associação entre os níveis de IL-6 e o tamanho do tumor, o estágio e a sobrevida livre de progressão. A IL-8 também foi impactada nos pronósticos da CCEO. Além disso, a IL-8 é crucial para o NETosis induzido por neoplasias (KOLAR, M et al. 2012). No estudo atual, os resultados da Bioinformática e ELISA foram consistentes entre si, uma vez que NET, IL-6 e IL-8 foram aumentados em pacientes com CCEO com RT.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

O estudo atual tentou investigar o efeito da RT em níveis de NETs em pacientes com OSCC. O achado mais importante do presente estudo sugeriu que a RT não alterou os níveis de NET, IL-6 ou IL-8. Além desse resultado, tem-se que o atual estudo demonstrou que os níveis de NETs, ??IL-6 e IL-8 foram aumentados em pacientes com OSCC, que não foram afetados pela radioterapia.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por doações do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo Pesquisa de Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Hospital Dilson Godinho, Montes Claros, MG Brasil. O Dr. Guimaraes, o Dr. Cunha, o Dr. De Paula e o Dr. Santos são pesquisadores do CNPq. Dr. Farias é investigador da FAPEMIG.

Referências bibliográficas

WCULEK, SK; MALANCHI I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. 2015;528(7582):413-7.

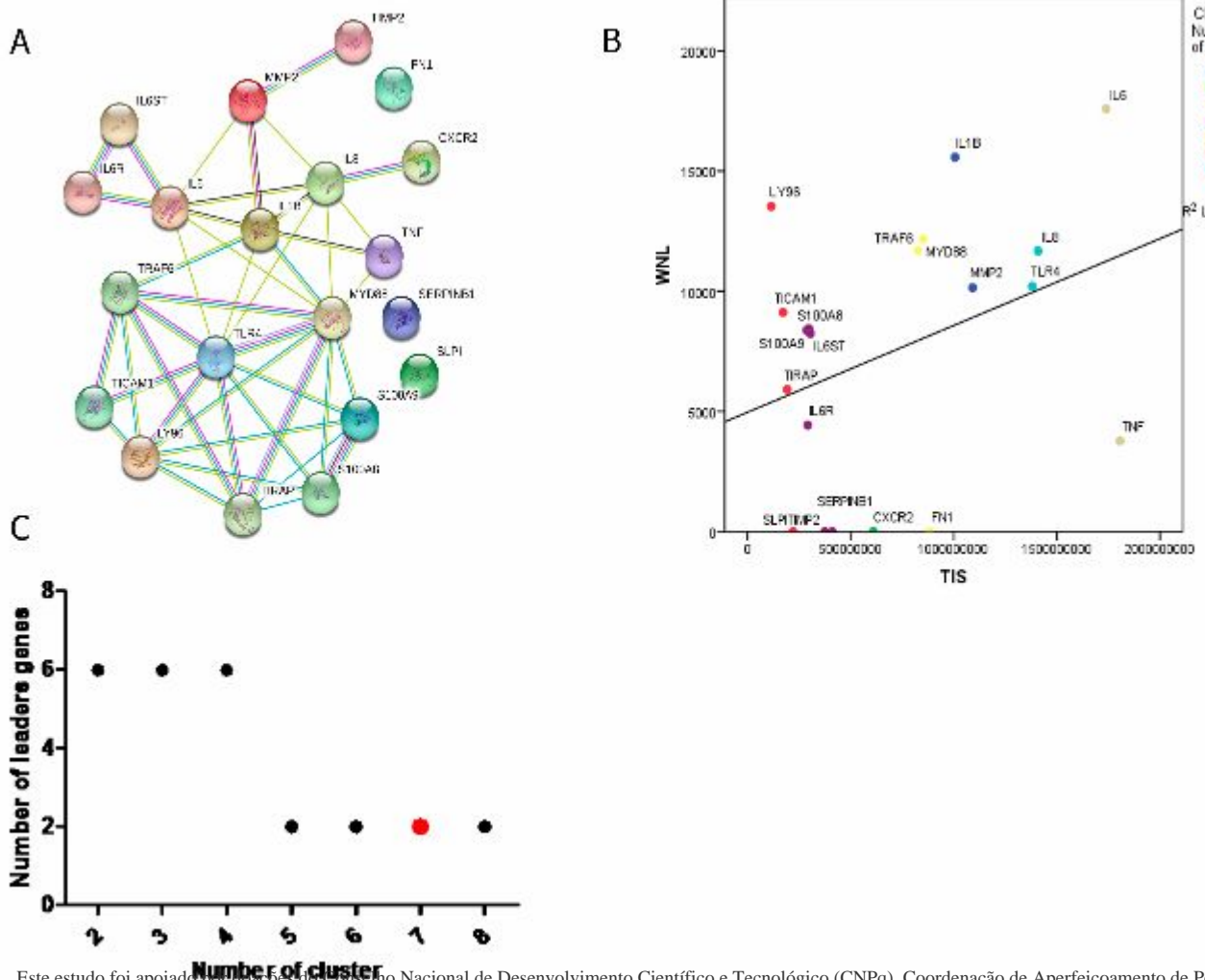
PARK, J; WYSOCKI, RW; AMOOZGAR Z; MAIORINO L; FEIN, MR; JORNS J; et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science translational medicine*. 2016;8(361):361ra138.

GARLEY, M; JABLONSKA, E; DABROWSKA, D. NETs in cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Onco developmental Biology and Medicine*. 2016;37(11):14355-61.

POSWAR, F de O; FARIAS, LC; FRAGA, CA; BAMBIRRA, W; BRITO-JUNIOR, M; SOUZA-NETO, MD; et al. Bioinformatics, interaction network analysis, and neural networks to characterize gene expression of radicular cyst and periapical granuloma. *Journal of endodontics*. 2015;41(6):877-83.

BRAGAZZI, NL; SIVOZHELEZOV, VCN. LeaderGene: A Fast Data-mining Tool for Molecular Genomics. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*. 2011;04(04).

KOLAR, M; SZABO, P; DVORANKOVA, N; LACINA, L; GABIUS, HJ; STRNAD, H; et al. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biology of the cell*. 2012;104(12):738-51.



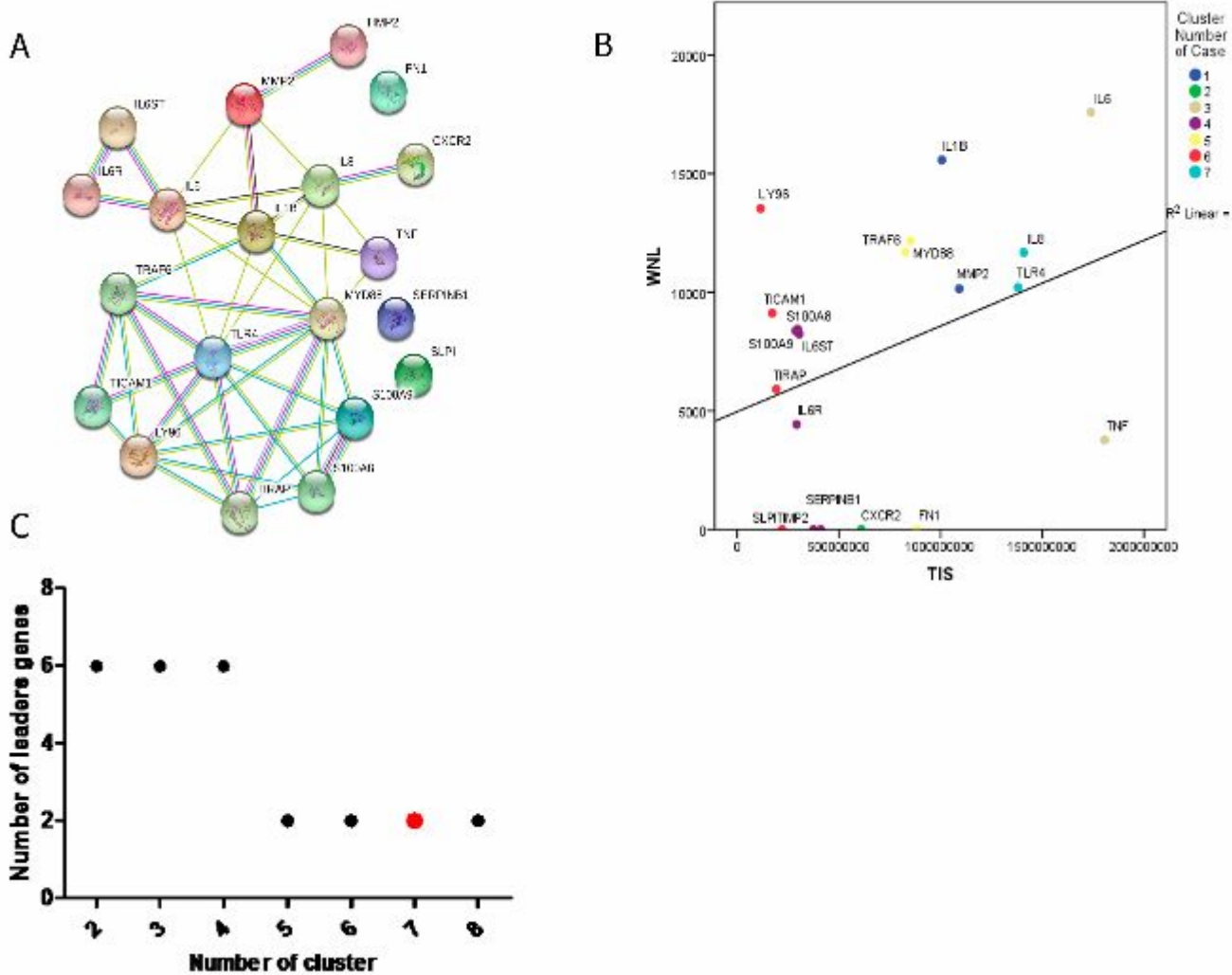
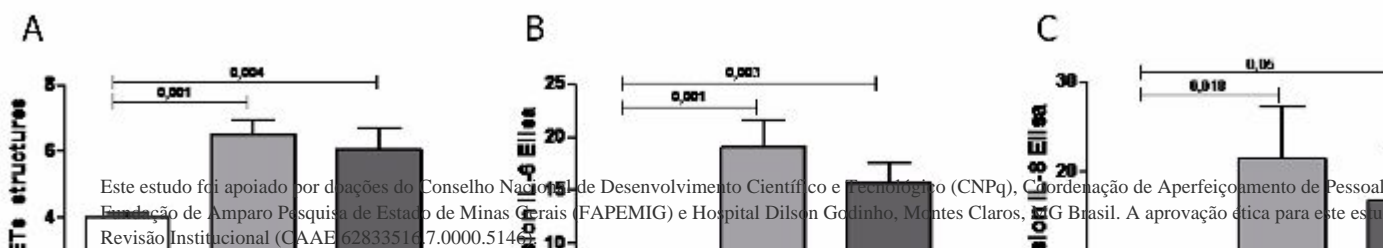


Figura 1. Genes líderes para a condição "Rede de neutrófilos extracelulares, inflamação, câncer bucal".

(A) O modelo de rede de interações entre genes / proteínas pertencentes a sub-redes de "Neutrófilos extra-celulares, inflamação e câncer oral" foi desenvolvido usando a ferramenta de pesquisa de recursos do banco de dados STRING 10, com um índice de confiança de 0,900. (B) Diagramas de dispersão que mostram o número ponderado de links relacionados à condição (WNL) versus a conectividade global Interações Total Score (TIS), genes envolvidos na condição. (C) O cluster de genes líderes em diferentes experiências de k-means sugere que o número ideal de líderes os genes são 2



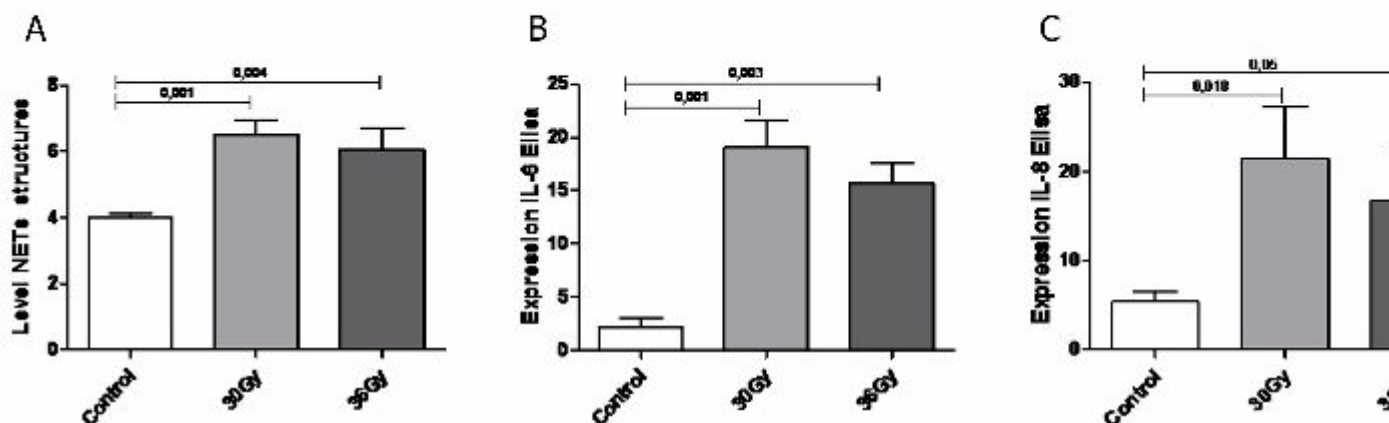


Figura 3. Efeito da radioterapia em redes de neutrófilos extracelulares, IL-6 e IL-8

Maiores níveis foram observados em comparação com o grupo controle em ambas as doses (30Gy e 36Gy) (p < 0,001). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as doses (p > 0,05).