

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS PRINCIPAIS GENES DE TGF- β EM
DIVERSOS TECIDOS SADIOS E TUMORAIS HUMANOS

ENRICO COSSI ARANTES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JANEIRO, 2022

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS PRINCIPAIS GENES DE TGF- β EM
DIVERSOS TECIDOS SADIOS E TUMORAIS HUMANOS

ENRICO COSSI ARANTES

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Dr. Arnaldo Rocha Façanha

Co-orientadora Dra. Brunna Xavier Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JANEIRO, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

A662

Arantes, Enrico Cossi.

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS PRINCIPAIS GENES DE TGF- β EM DIVERSOS TECIDOS SADIOS E TUMORAIS HUMANOS / Enrico Cossi Arantes. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

34 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024. Orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

1. TGF- β . 2. Citocinas. 3. Metabolismo tumoral. 4. Fatores de crescimento.. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS PRINCIPAIS GENES DE TGF- β EM
DIVERSOS TECIDOS SADIOS E TUMORAIS HUMANOS

ENRICO COSSI ARANTES

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 25 de abril de 2022

Comissão Examinadora

Prof. Abdalla Dib Chacur (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

Dr. Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis (D.Sc., Biotecnologia) – UENF

Dr. Milton Masahiko Kanashiro (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Dra. Brunna Xavier Martins (D.Sc. Biociência e Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

Prof. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc. Química Biológica) – UENF
(Orientador)

Agradecimentos

Aos meus pais pelo apoio, pela confiança e por sempre estarem ao meu lado principalmente neste momento acadêmico em que mais precisei deles.

À minha avó que me ensinou muito em vida e foi um exemplo de mulher forte.

À minha família que sempre confiou em mim e me deu apoio em todos os momentos.

Ao meu querido orientador Dr. Arnaldo Rocha Façanha por todos os ensinamentos, paciência e aprendizado desde a iniciação científica até a minha conclusão do Mestrado.

À minha Co-orientadora, Dra. Brunna Xavier Martins, pelos vários anos de amizade, compreensão, paciência, ensinamento, discussão do projeto e dedicação ao meu amadurecimento científico.

Ao doutorando e amigo Pedro Tiago que me ajudou e me trouxe os ensinamentos da Bioinformática, que foi de muita importância para o desenvolvimento deste projeto. Além de diversos momentos de diversão e ajuda que me ofereceu.

À doutoranda e amiga Leticia Cespom por sempre estar presente nesses tempos de pandemia e pela ajuda durante toda a minha jornada no mestrado.

Ao amigo Dr. Savio Bastos pelos momentos em Campos dos Goytacazes e por me ajudar no início do mestrado e nos experimentos de bancada.

Aos meus amigos do laboratório LBCT (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual), Arícia, Antônio, Juliana, Gil, Gabriel, Fred, Raul, Glenerson, Leticia, Rafael e Beatriz; agradeço por todos os esses anos de convivência de laboratório e pelos festivos momentos de descontração.

Às amigas das disciplinas cursadas durante o mestrado, Nayara Vigneron e Fernanda Soares por nos divertimos muito durante o curso.

À Heloysa Bousada pela amizade de anos que criamos durante a faculdade e até longe apoiamos um ao outro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação de Biociências e Biotecnologia que me ofereceu a oportunidade de um ensino público de qualidade e meu amadurecimento científico.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. O Câncer	9
2.2. O TGF- β	9
3. OBJETIVO	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Análises de Bioinformática	13
4.1.1. GTEX.....	13
4.1.2. GEPIA2	13
5. RESULTADOS	14
5.1. Expressão de TGF β e de seus receptores em tecidos normais	14
5.2. A expressão de TGF- β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de Glioma de Baixo Grau (<i>Low-grade gliomas - LGG</i>)	16
5.3. A expressão de TGF β e de seus receptores em tecidos normais e tecidos tumorais de adenocarcinoma pancreático (PAAD)	18
5.4. A expressão de TGF- β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de melanoma cutâneo (<i>Skin Cutaneous Melanoma – SKCM</i>).....	21
5.5. Expressão de TGF- β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de Câncer de Esôfago (<i>Esophageal Carcinoma – ESCA</i>).....	22
5.6. Expressão de TGF β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de Carcinoma Hepatocelular (<i>Liver hepatocellular carcinoma – LIHC</i>).....	24
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

Os Fatores de transformação do crescimento tipo beta (TGF- β) são proteínas sinalizadoras que apresentam uma diversidade de funções, sendo responsáveis pela ativação de vias de sinalização essenciais para a manutenção da homeostase celular, desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e em processos regenerativos e proliferativos. Também tem assumido grande importância nos estudos de progressão do câncer, como no melanoma onde o TGF- β 1 pode induzir efeitos contrastantes sobre a malignidade, dependendo da concentração, podendo exercer tanto uma ação supressora como estimuladora em diferentes tipos de tumores. A fim de entender melhor a multifuncionalidade desta citocina na carcinogênese, no presente trabalho estudamos a expressão dos três tipos de TGF- β e seus respectivos receptores, em diversos tecidos saudáveis e em amostras tumorais. Os padrões de expressão gênica de diferentes tecidos foram analisados utilizando dados de repositórios de RNA-Seq (GTEx), enquanto dados de expressão em tecidos tumorais foram obtidos utilizando a plataforma GEPIA. O resultado de tecidos cerebrais se destacou nas análises por apresentar baixíssimas expressões dos três fatores e três receptores TGF- β , em comparação aos demais tecidos. O heatmap revelou um padrão de expressão dos TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 bastante variado entre os diferentes tecidos, com marcante atenuação dos pixels em todos os tecidos saudáveis de origem cerebral. Todavia, ao analisar a expressão em gliomas, um marcante aumento se verificou na expressão do TGF- β 1. A expressão diferencial dos três receptores de citocinas, TGFBR1, 2 e 3, entre os diferentes tecidos estudados quando comparado aos de cérebro, pode estar relacionada a baixa capacidade regenerativa das células neuronais e a resposta imune especializada do tecido cerebral. Entretanto, quando se trata de tumores, como em gliomas e câncer pancreático, observam-se aumentos significativos especificamente na expressão em TGF- β 1 e seu receptor TGFBR1, corroborando com estudos prévios sobre o papel chave deste fator na proliferação celular tumoral. A integração desses dados com dados de estadiamento tumoral e prognósticos podem vir a validar as assinaturas de expressão dos fatores TGF- β e de seus

principais receptores como marcadores moleculares para prognósticos e tratamentos mais precisos de diferentes tipos de cânceres.

ABSTRACT

Beta-type transforming growth factors (TGF- β) are signaling proteins that plays a myriad of functions, responsible for the activation of signaling pathways essential for the maintenance of cellular homeostasis, embryonic development, cell differentiation and regenerative and proliferative processes. It has also assumed great importance in studies of cancer progression, such as in melanoma where TGF- β 1 can induce contrasting effects on malignancy, depending on the concentration, and can exert both a suppressive and stimulatory action on different types of tumors. In order to better understand the multifunctionality of this cytokine in carcinogenesis, in the present work we studied the expression of the three types of TGF- β and their respective receptors, in different healthy tissues and in tumor samples. Gene expression patterns from different tissues were analyzed using data from RNA-Seq repositories (GTEx), while expression data in tumor tissues were obtained using the GEPIA platform. The results from brain tissues stood out in the analyzes for presenting very low expressions of the three factors and three TGF- β receptors, compared to other tissues. A heatmap compilation revealed a pattern of expression of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 that varied greatly between different tissues, with marked attenuation of pixels in all healthy tissues of brain origin. However, when analyzing the expression in gliomas, a marked increase was found in the expression of TGF- β 1. The differential expression of the three cytokine receptors, TGFBR1, 2 and 3, between the different tissues studied when compared to the brain, may be related to the low regenerative capacity of neuronal cells and the specialized immune response of brain tissue. However, when it comes to tumors, such as gliomas and pancreatic cancer, significant increases are observed specifically in the expression of TGF- β 1 and its receptor TGFBR1, corroborating previous studies on the key role of this factor in tumor cell proliferation. The integration of these data with tumor staging and prognosis data may validate the expression signatures of TGF- β factors and their main receptors as molecular markers for more accurate prognoses and treatments of different types of cancer.

1. INTRODUÇÃO

Os fatores de transformação do crescimento beta (TGF- β) são proteínas sinalizadores do tipo citocina, que apresentam uma diversidade de funções celulares essenciais ao controle da homeostase celular. Ao todo, com base na similaridade de sequência e critérios funcionais, estes fatores são codificados no genoma humano, por trinta e dois genes agrupados nas subfamílias TGF- β e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (David e Massagué, 2018). A subfamília TGF- β compreende os três fatores principais (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), duas ativinas (A e B), fatores Nodal, GDFs [fatores de crescimento e diferenciação, GDF1, GDF3, GDF8 (miostatina), GDF9 e GDF11] e uma subfamília de dez BMPs (fatores de crescimento e diferenciação), além do hormônio anti-muelleriano. Membros adicionais codificam ligantes antagonistas e alguns *outliers*. O TGF- β 1, em particular, e suas duas isoformas TGF- β 2 e 3, são os membros que têm sido os mais relacionados ao processo de regulação imunológica, apesar de evidências crescentes estarem emergindo sobre papéis importantes dos BMPs na modulação do sistema imunológico (Chen e Dijke, 2016).

A tumorigênese mostra semelhanças com processos do desenvolvimento embriogênico normal, mas subvertidos por uma comunicação intercelular controlada por citocinas que agem de maneira autócrina, parácrina ou justácrina. Sob esta perspectiva, o TGF- β tem sido descrito como componente chave de uma via de sinalização tumoral, essencial para os processos de transição epitelial para mesenquimal (EMT) - mecanismo pelo qual as células cancerosas perdem sua polaridade e se separam umas das outras, adotando um fenótipo mesenquimal com plasticidade celular típica de células tronco e desenvolvem capacidade migratória, o que desencadeia processos de metástase (Hao et al., 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Câncer

O câncer é um termo genérico que abrange mais de 100 diferentes tipos de tumores cuja malignidade usualmente está relacionada a mutações genéticas e a um crescimento desordenado celular com a capacidade de invadir tanto tecidos próximos como órgãos distantes, podendo se espalhar pelo corpo (INCA, 2020). O câncer continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo responsável por aproximadamente 10 milhões de óbitos a cada ano (WHO, 2021). No Brasil, no ano de 2020 houve uma estimativa da ocorrência de aproximadamente 685.000 novos casos de câncer em homens e mulheres (INCA, 2020).

Os tumores malignos, apresentam um acelerado processo de divisão e proliferação celular, podendo ocorrer a propagação para outros tecidos através do sistema linfático ou pelo sistema circulatório, afetando a outros órgãos do corpo, caracterizando a metástase, o que constitui o maior desafio ao tratamento de pacientes, sendo a principal causa de morte (Geiger e Peeper, 2009). Grande parte dos pacientes que recebem um diagnóstico precoce, ao ter acesso a um tratamento eficiente, podem chegar mais facilmente à cura, sendo significativamente menor o percentual de óbitos nesses casos (ABRALE, 2021).

2.2. O TGF- β

O TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) é considerado uma citocina multifuncional envolvida na regulação de uma variedade de funções celulares, incluindo o controle do desenvolvimento embrionário, da diferenciação de células e tecidos, da morte celular programada, e da homeostase, proliferação e migração celulares, e mudanças associadas na matriz extracelular. A superfamília TGF- β é representada no genoma humano por pelo menos trinta e dois genes que codificam para vários tipos e isoformas destas citocinas. São pertencentes a este supergrupo não só os TGF- β mas também outras citocinas

como as ativinas (A e B), a substância inibidora mülleriana (MIS), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), os fatores de diferenciação de crescimento (GDFs) e o fator nodal.

Existem três isoformas de TGF- β , incluindo os TGF- β 1, 2 e 3, entretanto, o membro mais relevante da família do ponto de vista de regulação imunológica é o TGF- β 1. Dentre os receptores de TGF- β existem três tipos principais, sendo eles o TGFBR1, o TGFBR2 e o TGFBR3 (Vander Ark et al., 2018). A sinalização de TGF- β ocorre após a ligação do ligante aos seus receptores que estão localizados na região transmembranar da membrana plasmática, ao qual o sinal é então retransmitido por moléculas intracelulares localizadas no citosol celular (Hata e Chen, 2016).

A sinalização canônica mais conhecida do TGF- β ocorre quando um dos três ligantes de TGF- β se liga ao receptor TGFBR2, que então recruta e fosforila o TGFBR1 ativando sua atividade de quinase e fosforilando SMAD2 e SMAD3 que forma um complexo com SMAD4, regulando a transcrição gênica no núcleo (Hata e Chen, 2016; Miyazono et al., 2000). Vários estudos têm abordado a participação das redes de sinalização de TGF- β em neoplasias humanas (e.g., Dumont e Arteaga, 2003; Vander Ark et al., 2018; Liu et al., 2022).

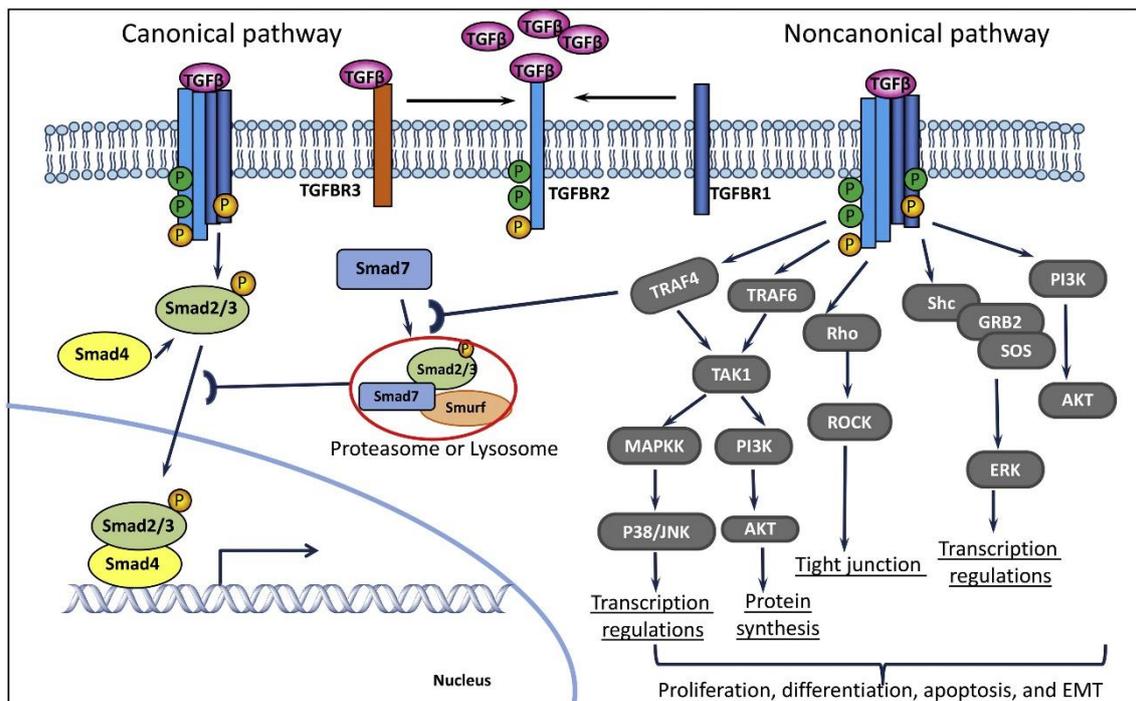


Figura 1. Vias de sinalização envolvendo a cascata de ativação do TGF-beta após a ligação ao receptor. O complexo Smad 2/3/4 é formado e leva a ativação de fatores de regulação transcricionais, síntese de proteínas, diferenciação celular e EMT (Vander Ark et al., 2018).

Tanto os ligantes de TGF- β quanto os seus receptores têm sido objeto de um grande número de estudos envolvendo câncer nas últimas décadas (Bierie e Moses, 2006). O TGF- β possui forte poder de inibição sobre a proliferação de células epiteliais, astrócitos e células do sistema imune, e é considerado ser um fator supressor tumoral. Alguns tumores adquirem mutações em elementos das vias de transdução de sinais, dependentes de TGF- β , para escapar da resposta citostática do TGF- β (Seoane, 2006). Por outro lado, alguns tumores malignos, incluindo gliomas, perdem seletivamente a capacidade do TGF- β de inibir a proliferação mantendo intacta as vias em que TGF- β interagem (Seoane, 2006).

Em células epiteliais normais e em células tumorais, o TGF- β pode agir como potente inibidor do crescimento celular, onde a cascata TGF- β /SMAD está relacionada a regulação e a expressão de vários genes pró-apoptóticos contribuindo para a supressão e a formação do melanoma humano. Mas, durante fases posteriores do desenvolvimento tumoral, as células carcinogênicas podem expressar e secretar alta quantidades de três isoformas do TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, nessa fase, a sinalização do TGF- β no melanoma leva ao aumento da proliferação celular, invasão, metástase e a transição das características epiteliais para mesenquimal (EMT). Assim, o TGF- β pode desempenhar um duplo papel durante a evolução tumoral, podendo levar tanto ao agravamento da malignidade, aumentando a progressão dos diversos tipos de cânceres, bem como podendo atuar também na supressão carcinogênica (Meulmeester e Dijke, 2010; Colak e Dijke, 2017).

Neste trabalho, nos dedicamos a descrever os padrões de expressão dos principais genes que desencadeiam a sinalização inicial do TGF- β em diferentes tecidos saudáveis e em vários tipos de tumores. Embora seja bem conhecido que o TGF- β exerce um duplo efeito em tumores como melanomas, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesse processo. Nos estágios iniciais do câncer, o TGF- β apresenta efeitos que demonstram inibir a progressão do ciclo

celular e promover a apoptose suprimindo a progressão tumoral. Entretanto, em estágios mais avançados, o TGF- β promove a capacidade de invasão tumoral e aumento da metástase (Syed, 2016).

3. OBJETIVO

Analisar a expressão dos genes que codificam as três isoformas principais de TGF- β e os seus três receptores em diversos tipos de tumores comparativamente aos respectivos tecidos/órgãos saudáveis, a fim de prover bases moleculares tecido-tumor específicas para embasar uma posterior exploração dos mecanismos de ação e da expressão diferencial desta citocina nos diferentes processos carcinogênicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análises de Bioinformática

4.1.1. GTEX

O GTEX é uma plataforma informatizada que coleta dados de expressão gênica em tecidos humanos e os disponibiliza publicamente. Foram minerados dados de expressão gênica de todos os tecidos presentes no banco de dados do GTEX, e realizada uma análise de expressão diferencial para identificar os genes TGF- β 1, 2 e 3, e de seus principais receptores. Compilamos os dados de expressão significativamente diferentes existentes entre os tecidos estudados a fim de preparar um mapa da presença desses genes nos diversos tecidos/órgãos. Utilizou-se análise estatística ANOVA para comparar os níveis de expressão gênica entre os tecidos estudados, utilizando o software *GraphPad Prism 8*.

4.1.2. GEPIA2

Utilizou-se a plataforma GEPIA 2 para analisar a expressão de genes do TGF- β e seu receptor em diferentes tipos de câncer (LGG, PAAD, SKCM, ESCA e LICH). Os dados de expressão gênica foram normalizados e apresentados em

gráficos boxplot. A análise de enriquecimento de vias foi utilizada para identificar as vias biológicas mais associadas aos genes selecionados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (v4.0.3; Tang e Zefang, 2019).

5. RESULTADOS

5.1. Expressão de TGF β e de seus receptores em tecidos normais

Heatmaps (Mapas de calor) foram estruturados para proporcionar análises comparativas da magnitude de expressão dos genes TGFB1, TGFB2 e TGFB3 diferencialmente expressos nos diversos tecidos analisados. Na figura 1, é possível visualizar que a expressão de TGFB2 é a menor entre os genes que codificam para TGF β em todos os tecidos que foram analisados, com alguma expressividade diferencial em tecidos glandulares/secretores, como a glândula salivar menor, e de tecidos de órgãos do sistema reprodutivo (próstata, ovário e endo/ectocervical). Percebemos também que nos tecidos cerebrais, o TGF β 2 é ainda menos expresso do que os TGF β 1 e 3 os quais já são pouco expressos nestes tecidos em comparação aos demais órgãos/tecidos analisados (Figura 1).

Na figura 2, é demonstrada a expressão dos genes dos receptores de TGF β 1, 2 e 3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3 no mesmo banco de dados de tecidos saudáveis da análise anterior de expressão gênica dos próprios fatores TGF β . Interessantemente, verificamos um padrão distinto do apresentado na figura 1, pois enquanto a expressão de TGF β 1 é reduzida em todos os tecidos analisados, verificou-se uma maior expressão especialmente de TGF β 2, a qual também se mostrou diferencial em relação aos tecidos analisados. Merece destaque a baixa expressão dos três receptores TGFBR1, 2 e 3 nos tecidos cerebrais (Figura 2).

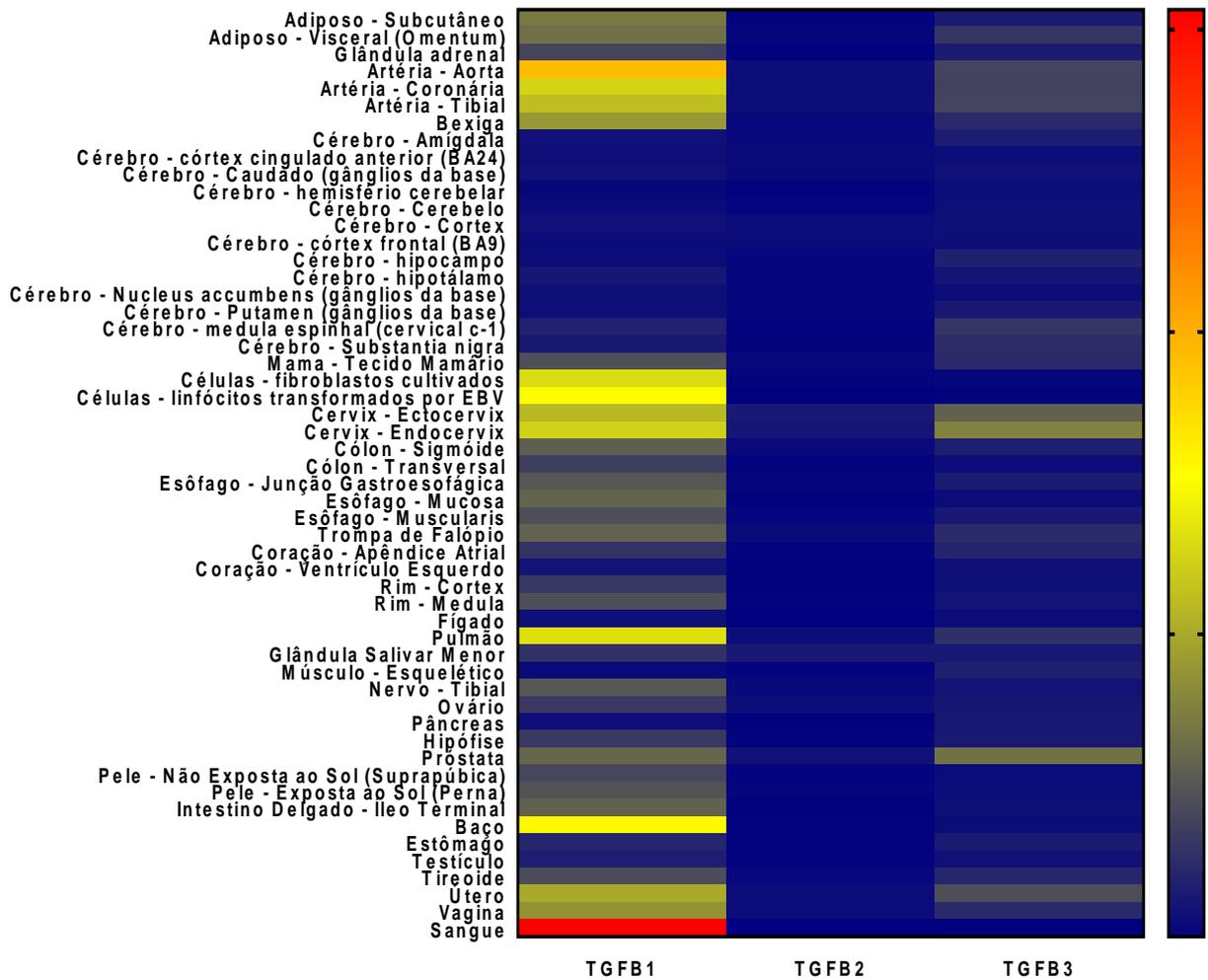


Figura 1. Expressão de TGFβ em tecidos normais. Mapa de calor que mostra a magnitude da expressão dos genes que codificam para os fatores TGFβ1, 2 e 3, e sua expressão diferencial nos tecidos/órgãos analisados. No eixo Y estão identificados todos os tecidos analisados e no eixo X estão os três genes do TGFβ. A expressão é representada com as cores azul (0 TPM), amarelo (153,2245 TPM) e vermelho (306,448 TPM). Dados pesquisados e compilados na plataforma GTEX.

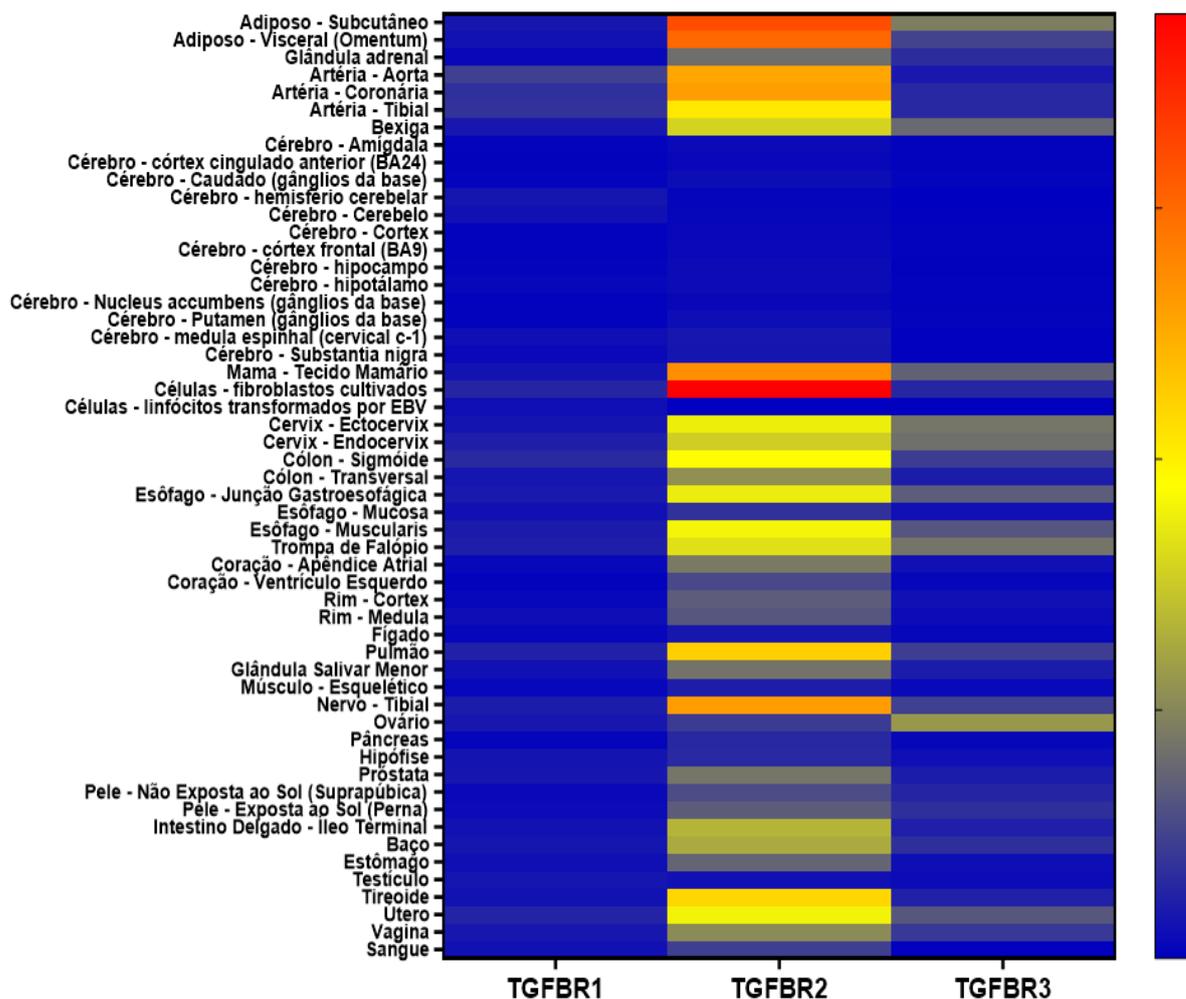


Figura 2. Expressão dos receptores TGF β em tecidos normais. Mapa de calor que mostra os genes que codificam para os receptores de TGF β diferencialmente expressos em diferentes tecidos. No eixo Y estão listados os tecidos normais analisados e no eixo X estão todos os genes dos receptores TGF β e genes sobrepostos do TGF β . A expressão é representada com as cores azul (0 TPM), amarelo (188,6 TPM) e vermelho (377.2 TPM). Dados pesquisados e compilados na plataforma GTEX.

5.2. A expressão de TGF- β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de Glioma de Baixo Grau (*Low-grade gliomas - LGG*)

A expressão de TGF β 1 foi maior em tecidos tumorais de glioma de baixo grau quando comparada sua expressão em tecidos normais (Figura 3 A). Enquanto, que neste tipo tumoral não se observou diferenças significativas na expressão de TGF β 2 e de TGF β 3 (Figura 3 B, C).

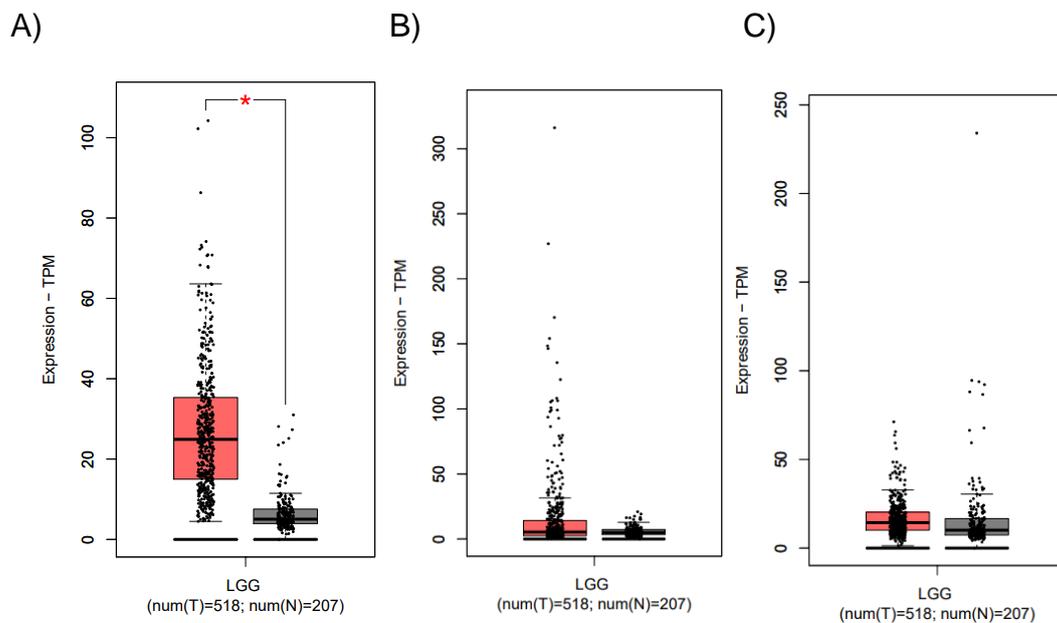


Figura 3. Expressão de TGF- β em Gliomas de Baixo Grau (LGG). Os gráficos representam a expressão de TGF β 1 (A), de TGF β 2 (B) e de TGF β 3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

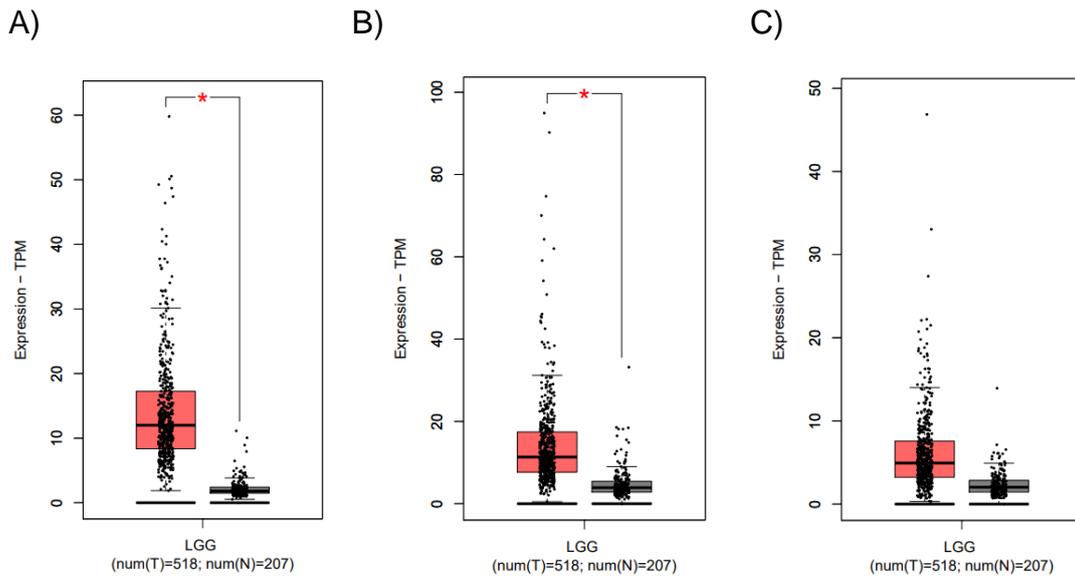


Figura 4. Expressão dos receptores do TGF- β em Glioma de Baixo Grau (LGG). Os gráficos representam a expressão de TGF β R1 (A), de TGF β R2 (B) e de TGF β R3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

Por outro lado, nas análises da expressão dos receptores de TGF β , foi demonstrado que a mediana de expressão foi maior no tumor para todos os receptores, TGF β R1, TGF β R2 e TGF β R3 (Figura 4 – A, B, C). No entanto, apenas a expressão de TGF β R1 e TGF β R2 apresentaram diferenças significativas quando comparado aos tecidos normais (Figura 4 A, B).

5.3. A expressão de TGF β e de seus receptores em tecidos normais e tecidos tumorais de adenocarcinoma pancreático (PAAD)

Os resultados baseados na expressão de TGF β demonstraram que os valores de expressão para o TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 foram estatisticamente maiores em amostras de tecidos tumorais de adenocarcinoma pancreático quando comparados a amostras de tecido normal (Figura 5 A, B, C).

Em relação a expressão dos receptores de TGF β , apenas os receptores TGF β R1 e TGF β R2 apresentaram diferenças significativas quando comparados a amostras de tecidos normais, sendo maiores em amostras de tecido tumoral de adenocarcinoma pancreático (Figura 6 A, B). Enquanto a expressão de TGF β R3 não apresentou diferença significativa entre tecidos normais e tumorais (Figura 6 C).

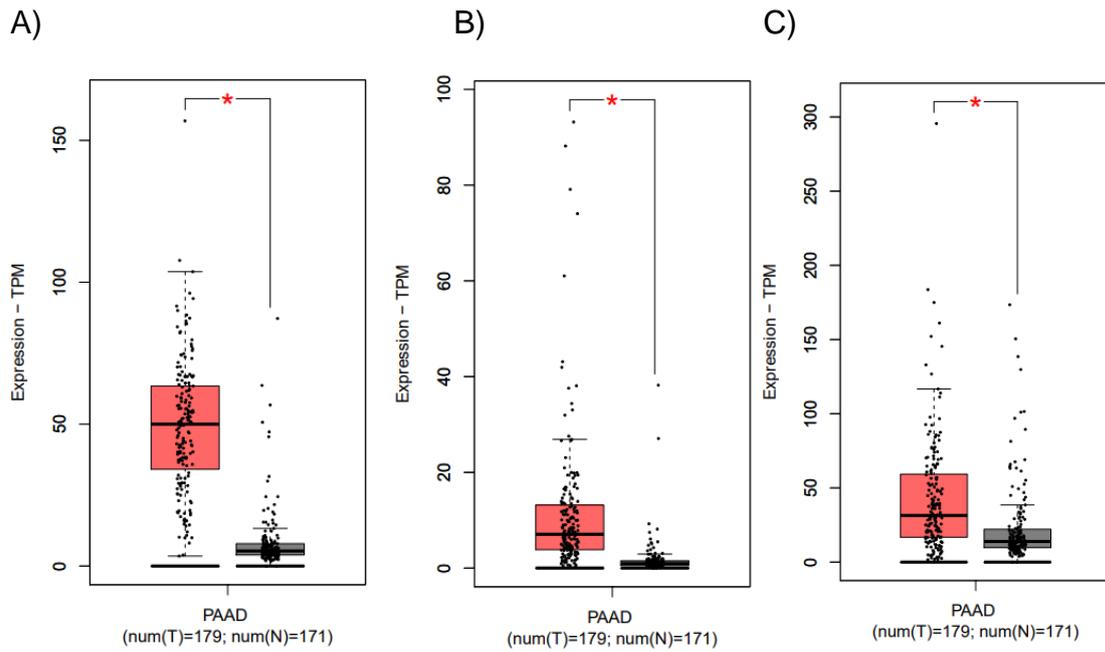


Figura 5. Expressão de TGFβ em Câncer de Pâncreas (PAAD). Os gráficos representam a expressão de TGFβ1 (A), de TGFβ2 (B) e de TGFβ3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

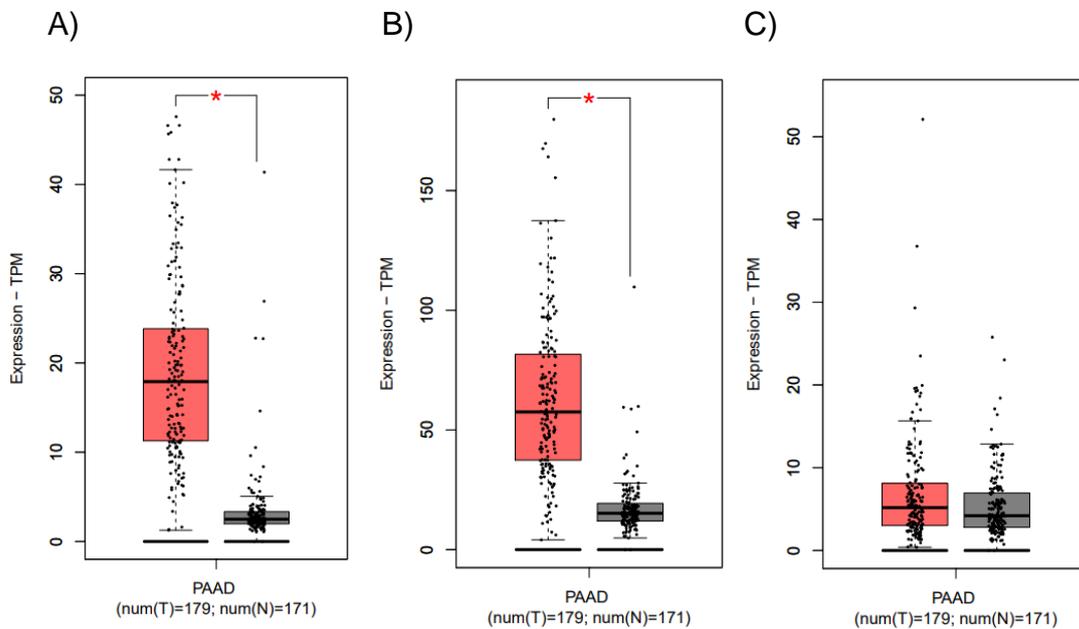


Figura 6. Expressão dos receptores do TGFβ em Câncer de Pâncreas (PAAD). Os gráficos representam a expressão de TGFβR1 (A), de TGFβR2 (B)

e de TGF β R3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

5.4. A expressão de TGF- β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de melanoma cutâneo (*Skin Cutaneous Melanoma – SKCM*)

Na avaliação comparativa da expressão de TGF β entre amostras de tecidos normais e de tecidos tumorais de melanoma cutâneo não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão para os três tipos de TGF β estudados (Figura 7). Por outro lado, o padrão de expressão dos receptores mostrou alterações significativas, sendo TGF β R1 mais expresso em tecidos tumorais de melanoma (Figura 8 A), em contrapartida, o receptor TGF β R3 foi menos expresso nos tecidos tumorais (Figura 8 C).

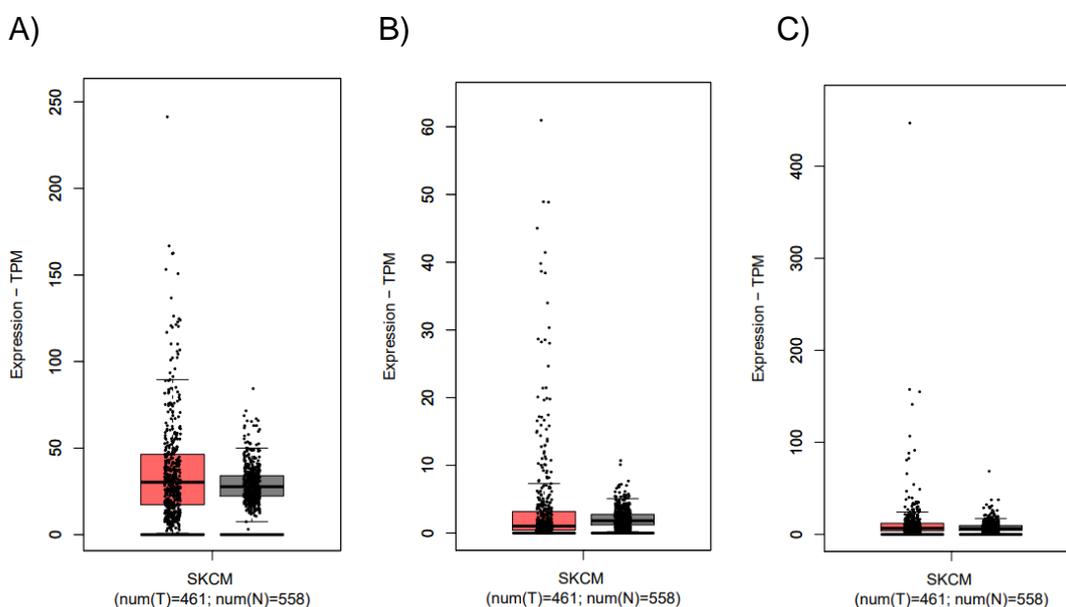


Figura 7. Expressão de TGF- β em Melanoma Cutâneo (SKCM). Os gráficos representam a expressão de TGF β 1 (A), de TGF β 2 (B) e de TGF β 3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

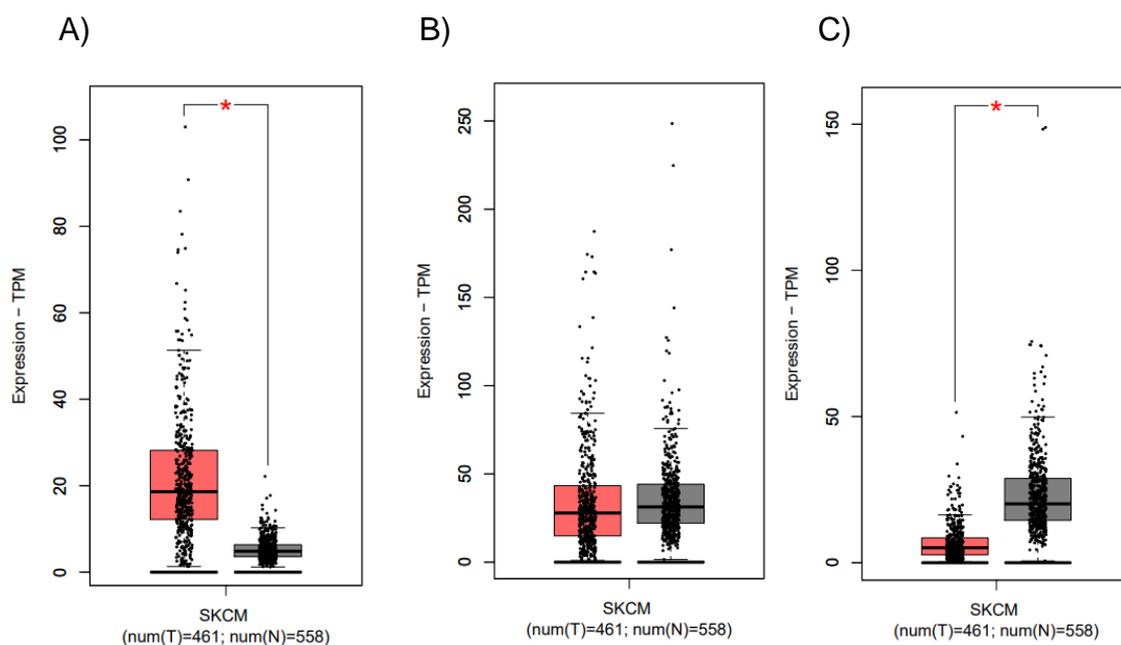


Figura 8. Expressão dos receptores do TGF-β em Melanoma Cutâneo (SKCM). Os gráficos representam a expressão de TGFβR1(A), de TGFβR2 (B) e de TGFβR3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

5.5. Expressão de TGF-β e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de Câncer de Esôfago (*Esophageal Carcinoma – ESCA*)

A expressão de TGFβ2 foi maior em tecidos com câncer de esôfago, quando comparados a tecidos normais sem a doença (Figura 9 B). Entretanto, para as isoformas TGFβ1 e TGFβ3, não houve diferença de expressão entre tecidos tumorais e tecidos saudios de esôfago (Figura 9 A, C).

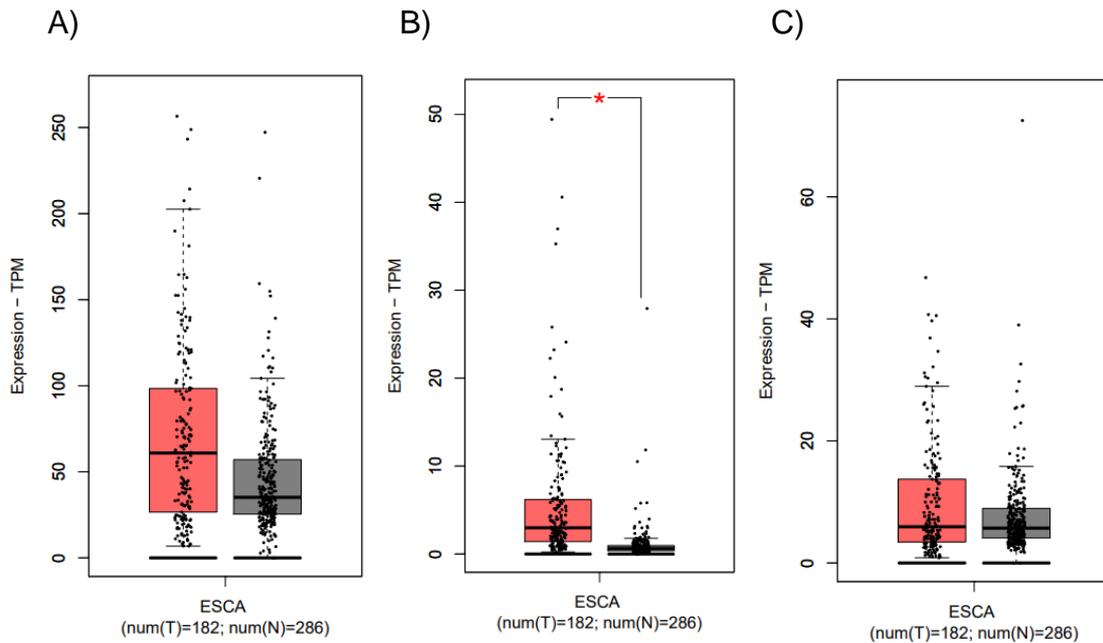


Figura 9. Expressão dos receptores do TGFβ em Câncer de esôfago (ESCA). Os gráficos representam a expressão de TGFβ1 (A), de TGFβ2 (B) e de TGFβ3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

A expressão dos receptores de TGFβ em ESCA revelou que apenas o TGFβR1 foi diferencialmente expresso em tecidos tumorais, apresentando regulação positiva da transcrição (Figura 10 A). Já os TGFβR2 e TGFβR3 não apresentaram diferenças significativas de expressão entre tecidos tumorais e sadios (Figura 10 B, C).

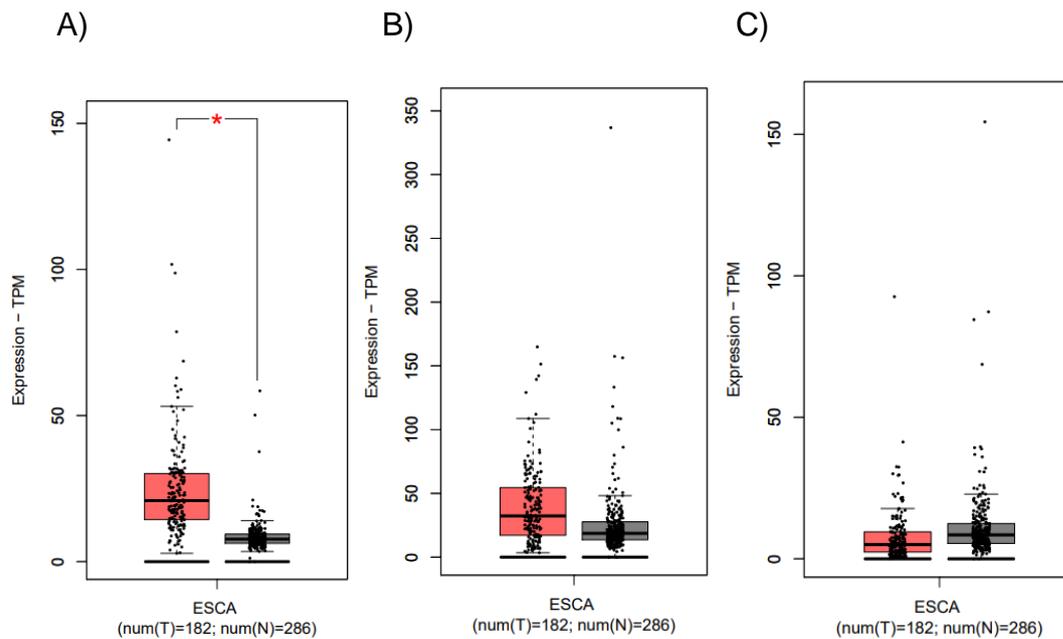


Figura 10. Expressão dos receptores do TGFβ em Câncer de esôfago (ESCA). Os gráficos representam a expressão de TGFβR1(A), de TGFβR2 (B) e de TGFβR3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Os dados apresentados foram pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

5.6. Expressão de TGFβ e de seus receptores em tecidos normais e tumorais de Carcinoma Hepatocelular (*Liver hepatocellular carcinoma – LIHC*)

Os três tipos de TGFβ e seus respectivos receptores não apresentaram diferenças na expressão gênica em tecidos tumorais de carcinoma hepatocelular quando comparados a tecidos normais (Figuras 11 e 12).

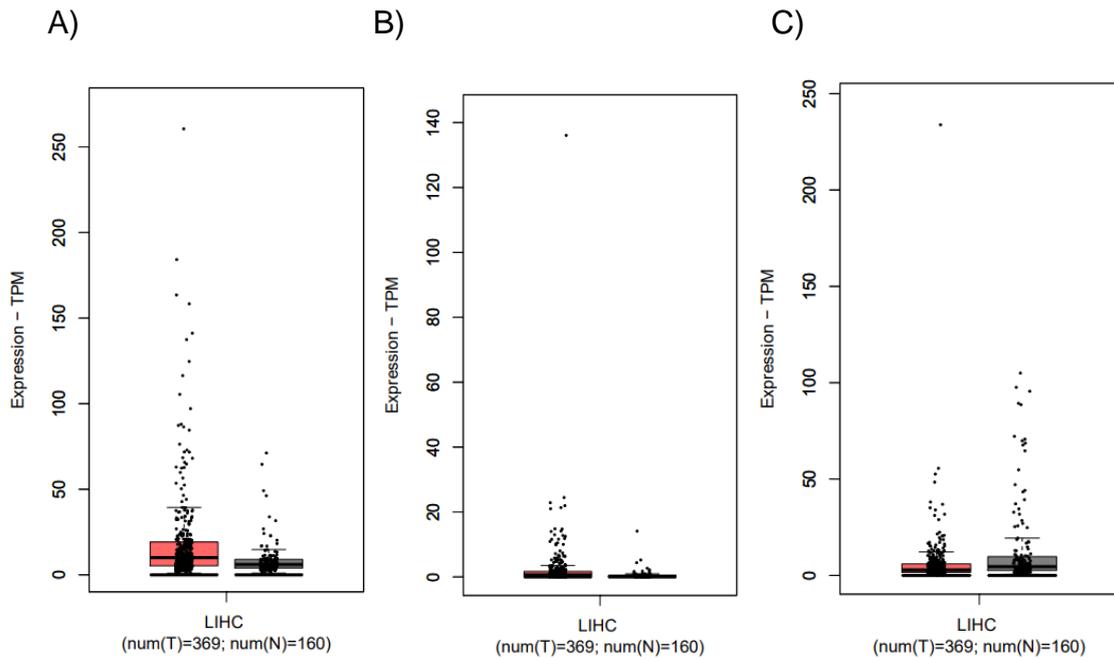


Figura 11. Expressão de TGFβ em Carcinoma hepatocelular (LIHC). Os gráficos representam a expressão de TGFβ1 (A), de TGFβ2 (B) e de TGFβ3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

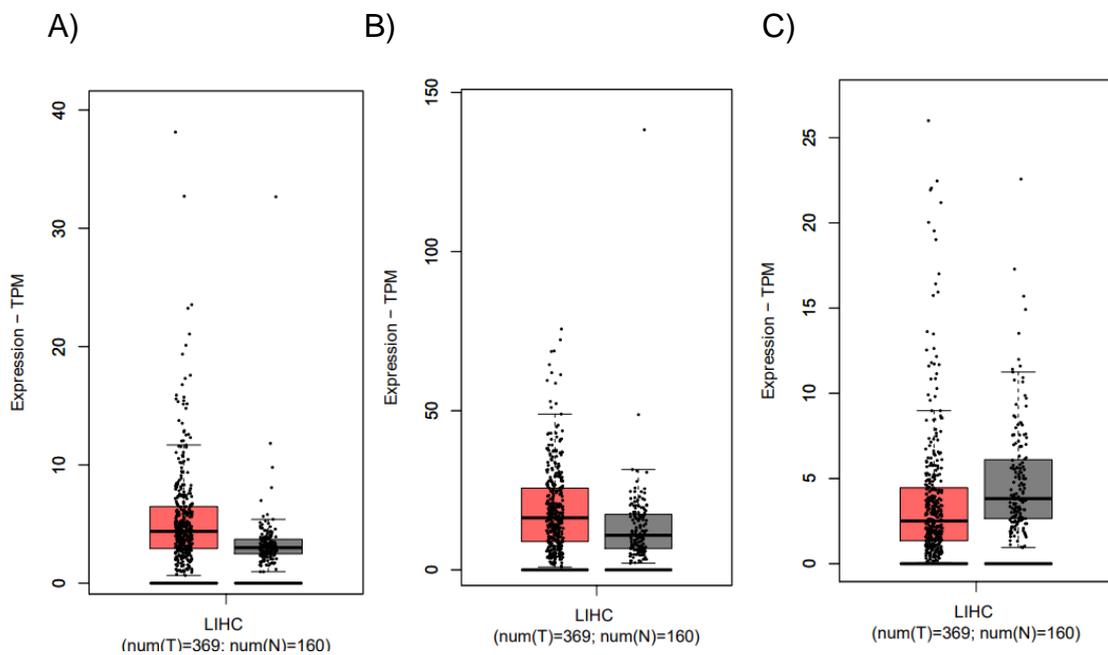


Figura 12. Expressão dos receptores do TGFβ em Carcinoma hepatocelular (LIHC). Os gráficos representam a expressão de TGFβR1 (A), de TGFβR2 (B) e

de TGF β R3 (C) em amostras de tecido tumoral (boxplot vermelho) e de tecido normal (boxplot cinza). Dados pesquisados e compilados na plataforma GEPIA2.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, as proteínas sinalizadoras TGF- β têm se destacado cada vez mais na pesquisa do câncer devido aos seus efeitos duais, podendo estimular ou inibir o desenvolvimento tumoral de forma diferenciada, dependendo do estágio do câncer e do padrão de expressão nos tecidos tumorais. Por essa razão, as citocinas TGF- β têm sido amplamente estudadas para compreender seu funcionamento e as possíveis atividades que desempenham. Essas proteínas são responsáveis pela ativação de múltiplas vias sinalizadoras, regulando diversas funções no corpo, incluindo a proliferação celular, a apoptose, a angiogênese e a transição epitélio-mesenquimal (EMT), importantes para o desenvolvimento tumoral. Uma compreensão mais aprofundada dessas atividades e a descrição detalhada das expressões diferenciais das proteínas relacionadas, pode fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra o câncer (Colak e Dijke, 2017; Derynck et al., 2021).

Nesse trabalho, utilizamos bancos de dados e plataformas informatizadas de *Data Mining* para poder obter e compilar dados sobre os diversos padrões de expressão em diferentes tecidos dos genes que codificam os três principais tipos de TGF- β e seus principais receptores, a fim de prover bases moleculares tecido-tumor específicas para uma posterior exploração dos mecanismos de ação e da expressão diferencial desta citocina nos diferentes processos carcinogênicos.

Nossos resultados revelaram um intrigante padrão de expressão diferencial destas proteínas, enfatizando um baixíssimo grau de expressão em todos os tecidos componentes do sistema nervoso, representados nos bancos de dados analisados. Tal distinção nos levou a buscar inicialmente se existiam padrões de expressão diferenciais para essas proteínas em banco de dados de

gliomas, um tipo de tumor ainda pouco relacionado com reprogramações metabólicas inerentes a sinalizações mediadas por TGF- β . Neste contexto, a participação mais bem descrita talvez seja a associação de TGF- β com SMAD2/3, relatada exercer atividades oncogênicas de ativação da proliferação de células de glioma, afetando o estado de metilação do gene de fatores de crescimento derivados de plaquetas (*platelet-derived growth factor- β , PDGF-B*), induzindo uma sinalização autócrina de PDGF-B nos microambientes tumorais (Guo et al., 2003).

Nossos dados ampliam a compreensão do papel destas citocinas nos tecidos cerebrais, ao revelar que tanto os genes que as codificam como os que codificam seus principais receptores, são mantidos praticamente silenciados em todos os tecidos saudáveis do sistema nervoso analisados. Por outro lado, verificamos que é o aumento da expressão de TGF β 1 e dos receptores TGF β R1 e TGF β R2, que pode estar relacionado com reprogramações epigenéticas do desenvolvimento de gliomas, como as relatadas por Guo e colaboradores (2003).

Inicialmente, é importante destacar a baixa expressão dos genes do TGF- β e seus receptores em tecidos saudáveis, o que pode estar relacionado com a estabilidade neuronal e a baixa capacidade de proliferação celular e regeneração destes tecidos. No entanto, nos gliomas, observa-se um aumento significativo na expressão dos genes do TGF- β e seus receptores, o que pode estar interferindo na estabilidade neuronal e contribuindo para o desenvolvimento tumoral.

Com base nessa premissa, foram realizadas comparações entre a expressão dos genes do TGF- β e seus receptores em tecidos tumorais e saudáveis, a fim de entender como essas proteínas sinalizadoras funcionam no desenvolvimento do tumor cerebral. Foram analisados tecidos de pâncreas e fígado, que possuem diferentes capacidades de regeneração, além dos tumores de esôfago e melanoma, que já haviam sido estudados pelo grupo de pesquisa. Essas análises contribuíram para uma melhor compreensão da doença.

Ao analisar as expressões dos genes no câncer de pâncreas, incrementos significativos foram observados nos genes TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TGF β R1, TGF β R2. Esse foi o tipo de tumor mais relacionado aos genes que controlam a expressão funcional do TGF- β , e aqui revelamos o papel da regulação positiva da transcrição dos receptores TGF β R1 e TGF β R2, cujo aumento pode ser futuramente relacionado com o grau de agressividade do tumor em cânceres específicos, como no câncer de pâncreas e em gliomas.

Realizamos análises de expressão gênica de TGF- β e seus receptores em dados de câncer de fígado, e não encontramos alterações significativas em nenhum dos genes analisados. Esses resultados estão em concordância com a literatura que indica que o TGF- β atua como um supressor tumoral nesse tipo de tumor. Porém, análises genômicas recentes mostraram que as assinaturas moleculares do TGF- β estão associadas às assinaturas de colapso do sistema imune em hepatocarcinomas, sugerindo que o TGF- β é um importante regulador imunológico e um biomarcador para câncer de fígado (Chen et al., 2019).

Ao analisar os genes do TGF- β no melanoma, nota-se inalterada a variação das expressões dos genes comparada a de tecidos saudáveis, mas se observa um aumento significativo no receptor TGF β R1, enquanto para o receptor TGF β R3 se observa uma diminuição da expressão. Um padrão parecido foi identificado em tumores de esôfago, mas neste caso, a mudança mais significativa se restringiu ao aumento de expressão de TGF β R1. Tais efeitos restritos a expressão diferencial de receptores TGF- β devem induzir futuras investigações visando estabelecer possíveis correlações existentes nas vias de reprogramação metabólica mediadas por TGF- β , comuns a estes dois tipos de cânceres e outros tipos de tumores que compartilhem de tais características.

Os padrões de expressão diferenciais aqui descritos para as citocinas TGF- β e seus receptores reforçam o potencial de desenvolvimento de novas terapias envolvendo a combinação de inibidores de receptores conjugados com outras fármacos antitumorais baseados em pontos chaves das vias de sinalização de TGF- β , como estratégia mais efetiva para melhores efeitos inibitórios sobre a proliferação celular, mobilidade e crescimento tumoral (Liu et al., 2021).

A maioria das estratégias terapêuticas tem se concentrado na eliminação das próprias células tumorais, mas células do sistema imune que se infiltram no microambiente tumoral também são alvos potenciais a serem explorados. Por exemplo, glioblastomas são altamente infiltrados com células da micróglia e macrófagos associados ao tumor (TAMs), que são conhecidas por sua capacidade de prover suporte às células do glioblastoma e promover a progressão do tumor (Andersen et al., 2021).

Em outra vertente, métodos de predição de risco baseadas em marcadores moleculares de expressão de TGF- β já estão sendo testadas com efetividade já comprovada para aprimorar o prognóstico do câncer de bexiga (Li et al., 2021). E neste contexto os padrões de expressão conjugados de fatores TGF- β e seus receptores podem configurar assinaturas moleculares que também venham a guiar tratamentos com precisão individual mais acurada.

Análises integrômicas multi-câncer recentes mostraram existir contribuições de mutações, amplificações, deleções, metilações de DNA e expressões de miRNA modulando a atividade transcricional da sinalização de TGF- β em cada tipo de câncer (Korkut et al., 2018). Tais resultados se coadunam com os obtidos em nosso estudo, demonstrando que existe uma ampla perspectiva molecular para futuros estudos funcionais e terapêuticos das diversas vias reprogramação metabólica do câncer mediadas por proteínas da superfamília TGF- β .

7. CONCLUSÃO

Os padrões de expressão diferencial aqui descritos tanto para os fatores TGF- β quanto para seus principais receptores, parecem estar intimamente relacionados ao controle tanto do potencial regenerativo quanto da proliferação celular em tecidos saudáveis e tumorais, suscitando explorações mais aprofundadas principalmente em amostras de cérebro e pâncreas. A integração desses dados com dados de estadiamento tumoral e prognósticos podem vir a validar as assinaturas de expressão dos fatores TGF- β e de seus principais receptores

como marcadores moleculares para prognósticos e tratamentos mais precisos de diferentes tipos de cânceres.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE - Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. (2021). O que é câncer? Recuperado em 16 de janeiro de 2022, de <https://www.abrale.org.br/doencas/o-que-e-cancer/?q=doencas/o-que-e-cancer>

Andersen, R. S., Anand, A., Harwood, D., & Kristensen, B. W. (2021). Tumor-Associated Microglia and Macrophages in the Glioblastoma Microenvironment and Their Implications for Therapy. *Cancers*, 13(17), 4255. <https://doi.org/10.3390/cancers13174255>

Bierie, B., & Moses, H. L. (2006). TGF- β and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(1–2), 29-40.

Chen, J., Gingold, J. A., & Su, X. (2019). Immunomodulatory TGF- β Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Trends in Molecular Medicine*, 25(11), 1010-1023. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.007>

Colak, S., & Dijke, P. t. (2017). Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer*, 3(1), 56-71.

Dumont, N., & Arteaga, C. L. (2003). Targeting the TGF β signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell*, 3, 531–536.

Geiger, T. R., & Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1796, 293-308.

Guo, P., Hu, B., Gu, W., Xu, L., Wang, D., Huang, H.-J. S., Cavenee, W. K., & Cheng, S.-Y. (2003). Platelet-Derived Growth Factor-B Enhances Glioma Angiogenesis by Stimulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Endothelia and by Promoting Pericyte Recruitment. *The American Journal of Pathology*, 162(4), 1083-1093. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63905-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63905-3)

Hata, A., & Chen, Y. G. (2016). TGF-beta signaling from receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8.

INCA. O que é cancer? [online]. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 16 jan. 2022.

KORKUT, A. et al. A Pan-Cancer Analysis Reveals High-Frequency Genetic Alterations in Mediators of Signaling by the TGF- β Superfamily. *Cell Systems*, v. 7, n. 4, p. 422-437.e7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.08.010>

LIU, C. C. et al. Disulfiram Sensitizes a Therapeutic-Resistant Glioblastoma to the TGF- β Receptor Inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, p. 10496, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms221910496>

LIU, Q. et al. Exploiting Canonical TGF β Signaling in Cancer Treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 21, n. 1, p. 16-24, 2022. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0891.

LIU, Z. et al. A Novel TGF- β Risk Score Predicts the Clinical Outcomes and Tumour Microenvironment Phenotypes in Bladder Cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 791924, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.791924>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Cancer. [online]. Washington, DC: OPS, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 16 jan. 2022.

SEOANE, J. Escaping from the TGF- β anti-proliferative control. *Carcinogenesis*, v. 27, p. 2148-2156, 2006.

SYED, V. TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem*, v. 117, p. 1279-1287, 2016.

VANDER ARK, A.; CAO, J.; LI, X. TGF- β receptors: in and beyond TGF- β signaling. *Cellular Signalling*, v. 52, p. 112-120, 2018.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. [online]. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 12 jan. 2022.