

A inflamação intestinal como promotor da tumorigénese: pistas sobre a base molecular envolvida

Intestinal inflammation promotes tumorigenesis: clues on the underlying molecular basis

Joana F. S. Pereira, Cláudia Bessa, Paulo Matos, Peter Jordan

peter.jordan@insa.min-saude.pt

Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A inflamação intestinal é uma doença crónica debilitante de origem multifatorial que afeta cerca de 25 000 portugueses. É também uma condição promotora para a tumorigénese no cólon. Um microambiente inflamatório fornece sinais de sobrevivência para as células cancerígenas, as quais respondem com mudanças no seu programa genético. RAC1B é um exemplo de um biomarcador que foi identificado num subconjunto de tumores colorretais, e cuja expressão está aumentada em amostras de doentes com doença inflamatória intestinal. Para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos, a expressão da proteína RAC1B foi analisada num modelo celular composto por uma camada epitelial de células colorretais Caco-2 cocultivadas simultaneamente com fibroblastos ou macrófagos. A mera adição da citocina CXCL2/MIP2α purificada, ou uma cocultura com macrófagos do tipo M1, responsáveis pela síntese de MIP2α *in vivo*, induziram um aumento significativo nos níveis da proteína RAC1B nas células colorretais. Este aumento foi ainda potenciado pela adição de fibroblastos derivados de carcinoma (CAFs) à cocultura com M1. Estes resultados permitiram identificar, molecularmente, como os sinais pró-inflamatórios do microambiente induzem alterações no programa genético das células tumorais colorretais, abrindo caminho para uma melhor compreensão do papel da inflamação na promoção de tumores.

_Abstract

Inflammatory bowel disease is a chronic disorder of multifactorial origin that currently affects around 25 000 Portuguese. It is also a condition for promoting the development of colorectal cancer. The inflammatory microenvironment provides survival signals for cancer cells, which respond with changes in their genetic program. RAC1B is an example for a biomarker previously identified in a subset of BRAF-mutated colorectal tumors, the expression of which was found increased in samples from patients with inflammatory bowel disease. In order to elucidate the underlying molecular mechanism, RAC1B expression was analyzed in a cell model composed of an epithelium-like layer of differentiated colorectal Caco-2 cells in co-culture with fibroblasts or macrophages. The presence of purified cytokine CXCL2/MIP2α, or a co-culture with M1-type macrophages (a source of MIP2α in vivo) induced a significant increase in RAC1B protein levels in colorectal cells. This increase was further potentiated when cancer-associated fibroblasts (CAFs) were added together with M1. The data identify a molecular link between pro-inflammatory signals from the microenvironment and alterations in the genetic program of colorectal tumor cells, paving the way for a better understanding of the role of inflammation in tumor promotion.

_Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são provocadas pelo sistema imunitário e causam dor abdominal e diarreia recorrentes, tendo um impacto debilitante para a saúde do doente, incluindo a necessidade de intervenções cirúrgicas. A doença de Crohn pode manifestar-se em diferentes partes do trato gastrointestinal enquanto a colite ulcerosa afeta sobretudo o cólon. As causas são multifatoriais com influência de fatores genéticos e ambientais, e a incidência tem vindo a aumentar no Mundo Ocidental, sobretudo em pessoas entre os 20 e 39 anos, atingindo assim a faixa mais ativa da população, com um impacto socioeconómico correspondente. Atualmente, em Portugal, estima-se que cerca de 25 000 pessoas sofrem de DII (1), com uma incidência aproximada de 150 novos casos por ano.

Para além dos sintomas, as DII aumentam o risco para o desenvolvimento de cancro colorretal (2,3). Segundo os dados de 2020 da Agência Internacional de Investigação sobre Cancro (IARC, na sigla em inglês) (4), a incidência do cancro do cólon em Portugal ronda os 10 000 novos casos, causando cerca de 4 000 mortos, em ambos os sexos. A grande maioria destes casos são tumores esporádicos, sem história familiar associada, nos quais a influência do ambiente e dos hábitos de vida do doente tiveram um papel determinante. Vários fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de cancro foram reconhecidos em estudos epidemiológicos (5), incluindo a prevalência de DII.

A inflamação é uma resposta essencial do organismo em caso de infeção microbiana ou danos aos tecidos. Através de uma sequência de eventos altamente regulada, a produção inicial de fatores pró-inflamatórios elimina células dani-



artigos breves_ n. 9

ficadas ou infetadas, e é seguida por uma fase de fatores anti-inflamatórios que permitem o processo de regeneração subsequente. A desregulação desta fase anti-inflamatória, ou a presença contínua de um estímulo pró-inflamatório nocivo, resultam numa inflamação crónica que lesa continuamente os tecidos afetados (6,7).

Nos últimos anos, um microambiente inflamatório tem sido reconhecido como uma condição promotora do desenvolvimento tumoral (8-10), pois fornece sinais de sobrevivência às células tumorais. Por exemplo, as células tumorais têm recetores para as citocinas produzidas por fibroblastos e macrófagos pertencentes ao microambiente inflamatório, e respondem com alterações na sua expressão génica através da ativação de vias pro-proliferativas, como a via do STAT3 e do NF- κ B (11). Com base nesta relação, é explicável o efeito anti-tumoral quimiopreventivo revelado pelas drogas anti-inflamatórias não-esteróides, tomados regularmente (12).

_Objetivo

A sobre-expressão da proteína RAC1B num subtipo de cancro do cólon foi identificado anteriormente em trabalhos de investigação realizados no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (13) e representa um potencial biomarcador de prognóstico, ou mesmo um novo alvo terapêutico. Sabe-se que níveis aumentados de RAC1B potenciam a sobrevivência de células tumorais, mas a origem da sua sobre-expressão permanece desconhecida. Dados de estudos recentes no INSA sugeriram que condições inflamatórias poderiam desencadear a sobre expressão de RAC1B no cólon (13,14). Com base nestes estudos, o objetivo deste trabalho foi validar a expressão de RAC1B em amostras de doentes com inflamação intestinal, e identificar, num modelo celular adequado, as moléculas inflamatórias envolvidas.

_Materiais e métodos

Cortes histológicos de amostras conservadas em parafina de doentes com doença inflamatória intestinal foram obtidos pelo biobanco do Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto (Prof. F. Magro e Prof.^a F. Carneiro), o seu RNA

extraído pelo *kit* RNeasy FFPE (Qiagen) e reverse-transcrito em cDNA. Por RT-PCR quantitativo foram amplificados os transcritos de RAC1 total e RAC1B (variantes resultantes do mesmo gene pelo processo conhecido como *splicing* alternativo) e quantificados segundo o método $\Delta\Delta$ Ct.

As células Caco-2 foram cultivadas sobre filtros de polietileno, com poros de 1 μ m, em meio RPMI suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino durante 10-15 dias, até atingirem uma resistência transepitelial de 1000 a 1200 Ohm. De seguida, os filtros foram transferidos para placas contendo as células controlo (Caco-2) ou do estroma (nomeadamente, fibroblastos (CT 5.3, linha derivada de um tumor) ou macrófagos (M1 ou M2, diferenciados *in vitro* a partir de monócitos THP-1)) e cocultivados durante 48 h. As citocinas segregadas para o meio de cultura estão a ser identificadas por incubação com o *array* de anticorpos AAH-INF-3-8 (RayBiotech Inc.) e visualizadas por quimioluminescência. Em alternativa, os filtros foram colocados em meio contendo a citocina CXCL2/MIP2 α purificada, adquirida comercialmente e previamente dissolvida em solução salina isotónica com albumina.

Para a análise de proteínas por *Western blot*, as células Caco-2 foram lisadas, os extratos separados por eletroforese em gel desnaturante, electro-transferidos para uma membrana, e as proteínas detetadas com anticorpos específicos. Os níveis de RAC1 total e de α -tubulina serviram de controlo interno.

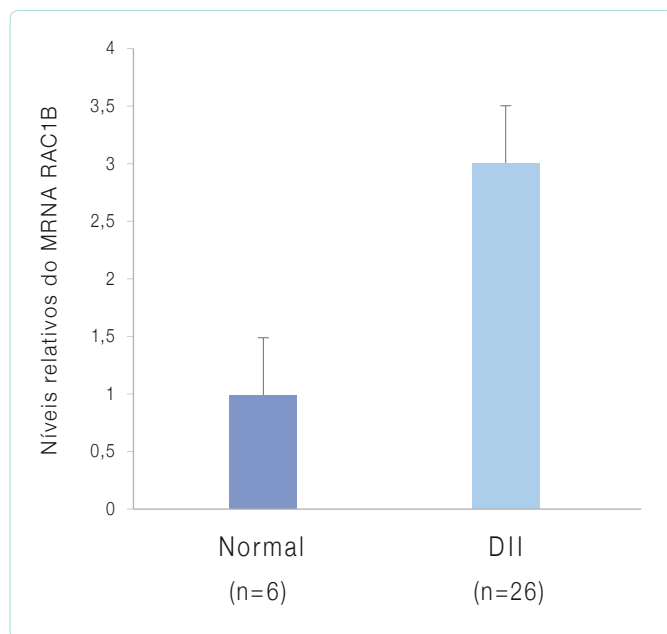
_Resultados e discussão

A análise de 26 amostras parafinadas de pacientes com doença inflamatória intestinal permitiu confirmar que existe uma tendência de sobre-expressão do RNA mensageiro de RAC1B nesta doença. Embora este estudo ainda conte com um número reduzido de amostras, os resultados sugerem que um ambiente inflamatório intestinal leva a um aumento da expressão de RAC1B nas células epiteliais do cólon (figura 1).

Para consolidar esta hipótese, tornou-se importante esclarecer quais os mecanismos moleculares subjacentes à indução



Figura 1: Quantificação por RT-PCR dos níveis de expressão do transcrito RAC1B em amostras em parafina de doentes com doença inflamatória intestinal.



da expressão de RAC1B em condições inflamatórias. Dado que uma análise *in situ* da mucosa do cólon iria fornecer uma imagem já resultante de um processo de evolução complexo, foi desenvolvido um modelo *in vitro* para analisar com maior precisão bioquímica, quais os intervenientes moleculares que estão na base do efeito observado.

O modelo recorreu à linha celular Caco-2, derivada de células tumorais de um doente com cancro colorretal, mas que mantém a capacidade de formar uma barreira eletrofisiológica comparável com as características da mucosa normal do cólon.

Como prova de princípio, foi adicionada ao meio das células Caco-2 a citocina CXCL2/MIP-2 α em forma purificada, pois foi demonstrado anteriormente num trabalho de colaboração do grupo que a expressão desta corelacionava, num modelo de ratinho para a inflamação crónica do cólon, com um aumento de RAC1B (15). As proteínas inflamatórias de macrófagos (MIPs) são citocinas quimiotáticas, produzidas por monócitos e macrófagos, que auxiliam no recrutamento

de neutrófilos para os locais de lesão ou infeção, mas também podem atuar sobre as células epiteliais (16). Na figura 2A mostra-se que a adição desta citocina ao meio de cultura de células Caco-2 polarizadas, sem presença de outras células pro-inflamatórias, era suficiente para induzir um aumento de RAC1B nas células Caco-2, mas isto não aconteceu com a adição do controlo escolhido, a citocina IL-11.

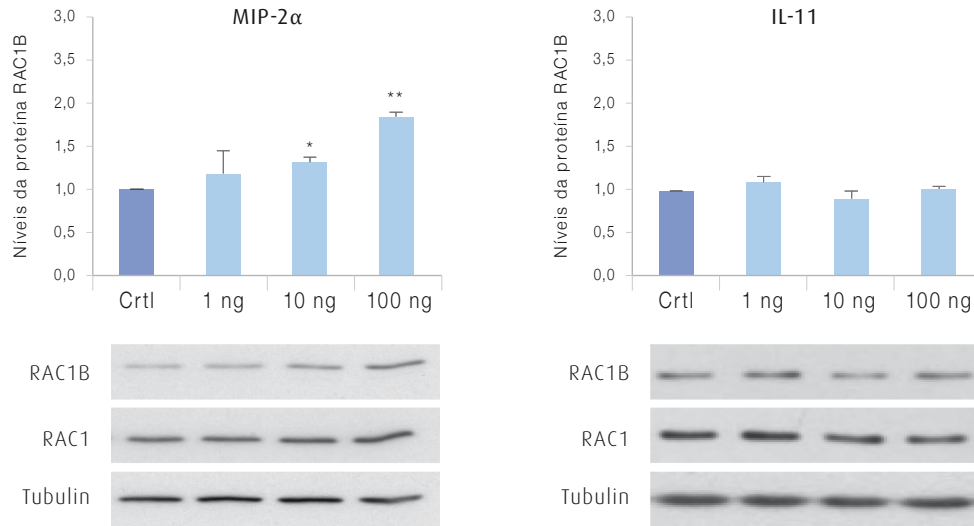
No sentido de mimetizar este efeito ectópico, estas células foram então cultivadas na presença de monócitos (THP1) e macrófagos diferenciados nos subtipos M1 (pro-inflamatório) ou M2 (imunossupressor) (figura 2B). Estas experiências revelaram que sobretudo a cocultura com macrófagos pró-inflamatórios M1 tinha a capacidade de induzir a produção da proteína RAC1B nas células Caco-2 (figura 2C), consistente com um efeito agonista das citocinas por estes segregadas. No entanto, sabe-se que outros tipos celulares também influenciam a o perfil de citocinas presentes no microambiente tumoral. Assim, adicionou-se à cocultura com os macrófagos M1 também fibroblastos derivados de tumores (CAFs). Verificou-se que a adição deste terceiro tipo celular ao modelo, potenciava ainda mais a expressão da proteína pro-tumoral RAC1B nas células colorretais (figura 2C). Estes resultados, sugerem que é a intercomunicação entre macrófagos, CAFs e células epiteliais, que desencadeia a sobre-expressão de RAC1B. Para determinar quais as citocinas envolvidas, neste modelo de cocultura estabelecido, encontra-se atualmente em curso um estudo bioquímico mais pormenorizado para determinar o perfil de citocinas que medeia a comunicação entre as células CAF ou M1 pro-inflamatórias, e as Caco-2, recorrendo a um *array* de anticorpos selecionados.

Espera-se que os resultados obtidos neste modelo *in vitro* venham a revelar quais as citocinas aumentadas, permitindo a sua correlação com as que se encontram elevadas no soro e no intestino de doentes com DII (17), e o seu consequente papel na promoção do cancro associado à colite (18,19).

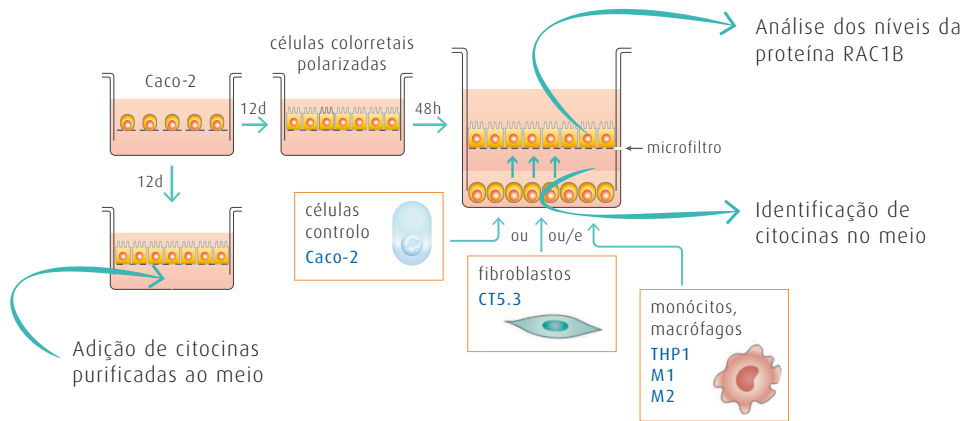


Figura 2: Identificação da base molecular envolvida na sobre-expressão de RAC1B em microambiente inflamatório.

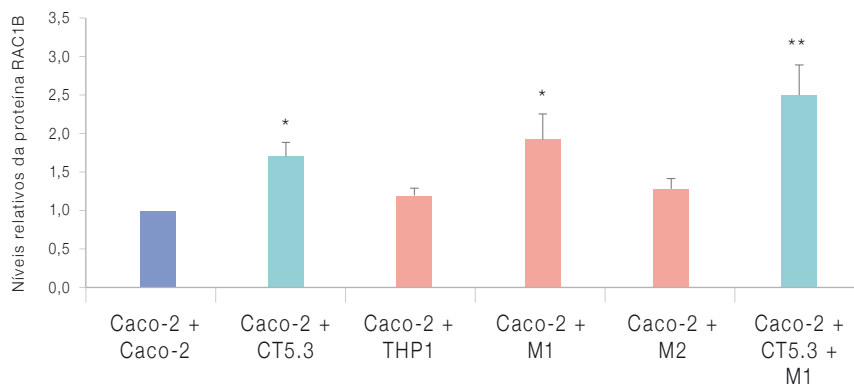
A — Níveis normalizados da proteína RAC1B nas células colorretais após incubação com as citocinas purificadas, MIP-2 α ou IL-11 (controlo).



B — Esquema resumo do modelo celular utilizado.



C — Níveis da proteína RAC1B detetada nas células colorretais sujeitas a diferentes coculturas.



* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.



_Conclusões

Este trabalho confirmou a sobre-expressão do biomarcador RAC1B em amostras de doentes com inflamação intestinal e identificou que citocinas geradas por um microambiente inflamatório podem desencadear, em células tumorais, essa sobre-expressão. Os resultados exemplificam molecularmente o efeito que a inflamação tem na progressão da doença oncológica, e sugerem que anticorpos terapêuticos, ou inibidores farmacológicos das vias associadas, poderão ter o potencial de reverter o efeito pro-tumorigénico observado, reduzindo a incidência de casos de cancro colorretal associado à DII.

Financiamento:

Os autores agradecem o apoio financeiro da FCT (bolsa SFRH/BD/109162/2015 e verba UID/MULTI/04046/2019 atribuído ao BioISI), do Grupo de Estudo da Doença Inflamatória Intestinal (bolsa GEDII 2013), e da bolsa INSA BRJ-DGH 2012_oncologia.

Referências bibliográficas:

- (1) Santiago M, Magro F, Correia L, et al. What forecasting the prevalence of inflammatory bowel disease may tell us about its evolution on a national scale. *Ther Adv Gastroenterol*. 2019 Aug 21;12:1756284819860044. <https://doi.org/10.1177/1756284819860044>
- (2) Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 7;18(29):3839-48. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i29.3839>
- (3) Yalchin M, Baker A-M, Graham TA, et al. Predicting Colorectal Cancer Occurrence in IBD. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 10;13(12):2908. <https://doi.org/10.3390/cancers13122908>
- (4) Cancer Today - IARC - Estimated number of incident cases and deaths in Portugal in 2020, both sexes, all ages [online]. International Agency for Research on Cancer, 2021. [consult. 21/7/2021]. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=620&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_it_ems=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D
- (5) Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 22;13(9):2025. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- (6) Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):771-6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- (7) Camba-Gómez M, Gualillo O, Conde-Aranda J. New Perspectives in the Study of Intestinal Inflammation: Focus on the Resolution of Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2605. <https://doi.org/10.3390/ijms22052605>
- (8) Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- (9) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19;264(20):691-7. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- (10) Terzić J, Grivennikov S, Karin E, et al. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2101-2114.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- (11) Pereira JFS, Jordan P, Matos P. A Signaling View into the Inflammatory Tumor Microenvironment. *Immuno*. 2021;1(2):91-118. <https://doi.org/10.3390/immuno1020007>
- (12) Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, et al. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005 Aug 24;294(8):914-23. <https://doi.org/10.1001/jama.294.8.914>
- (13) Matos P, Oliveira C, Velho S, et al. B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology*. 2008 Sep;135(3):899-906. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.052>
- (14) Matos P, Kotelevets L, Goncalves V, et al. Ibuprofen inhibits colitis-induced overexpression of tumor-related Rac1b. *Neoplasia*. 2013 Jan;15(1):102-11. <https://doi.org/10.1593/neo.121890>
- (15) Kotelevets L, Walker F, Mamadou G, et al. The Rac1 splice form Rac1b favors mouse colonic mucosa regeneration and contributes to intestinal cancer progression. *Oncogene*. 2018 Nov;37(46):6054-6068. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0389-7>
- (16) Phinney BB, Ray AL, Peretti AS, et al. MK2 Regulates Macrophage Chemokine Activity and Recruitment to Promote Colon Tumor Growth. *Front Immunol*. 2018 Sep 21;9:1857. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01857>
- (17) Florholmen J, Fries W. Candidate mucosal and surrogate biomarkers of inflammatory bowel disease in the era of new technology. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Dec;46(12):1407-17. <https://doi.org/10.3109/00365521.2011.627449>
- (18) Luo C, Zhang H. The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediat Inflamm*. 2017;2017:5126048. <https://doi.org/10.1155/2017/5126048>
- (19) Mager LF, Wasmer M-H, Rau TT, et al. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2016 Apr 19;6:96. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00096>