XVII CICURV
Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde

Análise de sobrevida em pacientes com câncer de mama: a experimentação computacional à favor das ciências da saúde

Carolina Leão de Moraes[1], Natália Cruz e Melo[2], Carolina Rodrigues de Mendonça[3], Fernanda Sardinha de Abreu Tacon[4], Waldemar Naves do Amaral[5], Jair Pereira de Melo Júnior[6]

[1] Acadêmica do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde (PIVIC/UniRV). E-mail: carolina.famervmed12@gmail.com
[2] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia da Escola de Medicina da Universidade Federal de São Paulo
[3] Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás
[4] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás
[5] Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás
[6] Docente Orientador do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde (PIVIC/UniRV)

Reitor:
Prof. Me. Alberto Barella Netto

Pró-Reitor de Pesquisa e Inovação:
Prof. Dr. Carlos César E. de Menezes

Editor Geral:
Prof. Dr. Fábio Henrique Baia

Editor de Seção:
Profa. Dra. Andrea Sayuri Silveira Dias Terada
Prof. Dr. Hidelberto Matos Silva

Correspondência:
Carolina Leão de Moraes

Fomento:
Programa PIBIC/PIVIC UniRV/ CNPq 2021-2022

Resumo: Proteínas dissulfeto isomerase, relacionadas a oncogênese, tem instigado novos estudos que buscam verificar se ambas podem ser usadas como biomarcadores de diagnóstico e terapia alvo para o câncer de mama. Objetivou-se, nesta pesquisa, caracterizar o valor prognóstico dos genes AGR2 e AGR3 em câncer de mama, através de uma experimentação computacional, denominada análise in silico. A análise de sobrevida foi avaliada usando o software Kaplan-Meier Plotter, plataforma de acesso público capaz de avaliar o efeito de genes na sobrevida em cânceres. A baixa expressão de AGR2 foi associada a pior sobrevida global (HR = 0,63 p = 0,0039) e pior sobrevida livre de doença (HR = 0,69 p = 2,2e-5). Em relação ao AGR3, a baixa expressão desse gene também foi associada a pior sobrevida global (HR = 0,49 p = 7,9e-6) e pior sobrevida livre de doença (HR = 0,58 p = 1,5e-11). Diante destes achados, as proteínas dissulfeto isomerase podem auxiliar na tomada de decisões na previsão de diagnóstico e no tratamento, contribuindo para a melhoria da sobrevida global e sobrevida livre de doença das pacientes acometidas por câncer de mama.

Palavras-chave: Biomarcadores. Isomerases de Dissulfetos de Proteínas. Neoplasias da Mama. Simulação por Computador.

Survival analysis in breast cancer patients: computational experimentation in favor of health sciences

Abstract: Proteins disulfide-isomerase, related to oncogenesis, have instigated new studies that seek to verify whether both can be used as diagnostic biomarkers and targeted therapy for breast cancer. The objective of this research was to characterize the prognostic value of the AGR2 and AGR3 genes in breast cancer, through a computational experiment, called in silico analysis. Survival analysis was evaluated using the Kaplan-Meier Plotter software, a publicly accessible platform capable of evaluating the effect of

UniRV
Universidade de Rio Verde

genes on cancer survival. Low AGR2 expression was associated with worse overall survival (HR = 0.63 p = 0.0039) and worse disease-free survival (HR = 0.69 p = 2.2e-5). Regarding AGR3, low expression of this gene was also associated with worse overall survival (HR = 0.49 p = 7.9e-6) and worse disease-free survival (HR = 0.58 p = 1.5e-11). In view of these findings, proteins disulfide-isomerase can assist in decision-making in predicting diagnosis and treatment, contributing to the improvement of overall survival and disease-free survival of patients with breast cancer.

Key words: Biomarkers. Breast Neoplasms. Computer Simulation. Protein Disulfide-Isomerases.

Introdução

Por muitos anos, o câncer de mama tem apresentado a maior incidência dentre todos os cânceres em mulheres no mundo (FENG et al., 2018). É o câncer mais comumente diagnosticado no sexo feminino nos Estados Unidos (EUA) (excluindo os cânceres de pele) e é a segunda principal causa de morte por câncer entre mulheres, depois do câncer de pulmão (DESANTIS et al., 2019). Atualmente, apresenta-se como um grande problema de saúde pública, devido a sua alta incidência, mortalidade e ao impacto econômico gerado (FENG et al., 2018). A mais recente estimativa mundial, publicada no ano de 2018, aponta que ocorreram no mundo 2,1 milhões de casos novos de câncer de mama, o equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados. O valor corresponde a um risco estimado de 55,2 casos a cada 100 mil mulheres (BRAY et al., 2018). No sexo feminino, o câncer de mama é o mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer na maioria dos países, estimando-se 626.679 mortes em 2018 (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019).

Em virtude dos impactos gerados pelo câncer, pesquisadores de todo o mundo trabalham incansavelmente para realizar novas descobertas e acelerar o ritmo das pesquisas destinadas a melhorar o diagnóstico, tratamento e prevenção do câncer. Um projeto pioneiro, iniciado em 2005, realizado com recursos da comunidade e, portanto, de acesso aberto ao público, chamado Atlas do Genoma Humano (TCGA) permitiu avanços na nossa compreensão acerca dessa doença. É uma publicação em grande escala, liderada pelo National Cancer Institute (NCI) e o National Human Genome Research Institute (NHGRI) para mapear as mudanças genômicas e epigenômicas que ocorreram em 33 tipos de câncer humano, incluindo nove tumores raros (WANG et al., 2016; COOPER, et al., 2018). Cada tipo de câncer foi analisado individualmente para identificar alterações específicas do tecido e fazer correlações em diferentes plataformas moleculares (COOPER, et al., 2018). Em janeiro de 2015, TCGA gerou cerca de 1,7 pentabytes de dados para cerca de 11.500 casos de tumor e amostras de tecido normais correspondentes (WANG et al., 2016). Desde então, pesquisadores de todo o mundo utilizam este, e outros bancos de dados públicos, para realizarem pesquisas acerca dos diversos tipos de cânceres, incluindo o de mama.

Embora o câncer de mama seja uma das neoplasias mais comumente estudadas, não há completo entendimento acerca do mecanismo e da patogênese envolvidos nessa doença, o que limita a sua prevenção e a eficiência dos tratamentos. Salienta-se que, apesar dos grandes avanços na classificação dos tumores de mama, uma das principais áreas de pesquisa em câncer de mama é a busca por novos biomarcadores. Talvez o maior desafio no entendimento da biologia do câncer de mama, na escolha de tratamento e na determinação do prognóstico das pacientes, esteja numa distinção adequada dos subtipos do câncer de mama, capaz de superar a heterogeneidade encontrada de forma eficiente e reprodutível. Apesar da ampla gama de possíveis biomarcadores que vêm sendo descritos e que podem auxiliar nesta problemática, ainda existe uma grande complexidade genética no câncer de mama, que instiga novas pesquisas. Ferramentas, como o TCGA, são extremamente importantes para estudos genômicos de alta qualidade, uma vez que permite que os dados sejam combinados e extraídos repetidamente para fazer descobertas adicionais, muitas vezes aplicando novos algoritmos e métodos de análise (WANG et al., 2016).

As Proteínas de Dissulfeto Isomerase (PDI) foram descobertas a mais de 50 anos, contudo, somente agora, inicia-se uma nova jornada para entender como ela desempenha papéis multifuncionais em diversas fisiopatologias, incluindo o câncer, e como pode ser aproveitada para melhorar a saúde (WANG et al., 2020). Estudos estruturais e funcionais recentes têm demonstrado que os membros da PDI não só desempenham um papel essencial na síntese de secreção de proteínas, mas também exercem diversos efeitos em distúrbios humanos, que incluem, além do câncer, doenças neurodegenerativas, doenças metabólicas, osteogênese im-

perfeita, doenças infecciosas e doenças cardiovasculares (LEE; LEE, 2017; MATSUSAKI et al., 2020; WANG et al.,2020). As PDI são altamente expressas em vários tipos de câncer, mas o papel exato da PDI em apoiar a sobrevivência e progressão do tumor não é claro (WANG et al., 2020). Contudo, evidências crescentes sugerem que as PDIs estão ativamente envolvidas na proliferação, sobrevivência, metástase e angiogênese de vários tipos de células cancerosas (LEE; LEE, 2017; WANG et al.,2020), sendo sua alta expressão relacionada a baixa taxa de sobrevivência dos pacientes que possuem tumores que são regulados positivamente por essas proteínas (WANG et al., 2020). Entre as PDI, as Proteínas Anterior Gradiente (AGRs) são as mais relacionadas a oncogênese (FESSART et al., 2016) e vários estudos destinam-se a verificar se elas podem ser usadas como biomarcadores para o diagnóstico e ser um potencial alvo de drogas para a terapia do câncer (WANG et al., 2020).
São escassos os estudos de valor prognóstico dos genes AGR2 e AGR3 em câncer de mama. Os mecanismos associados a estes genes no desenvolvimento tumoral ainda são desconhecidos e merecem maiores investigações. A experimentação computacional, denominada análise *in silico*, possibilita construir e simular sistemas voltados para a predição de propriedades e comportamentos biológicos. Neste contexto, objetiva-se caracterizar o valor prognóstico dos genes AGR2 e AGR3 em câncer de mama.

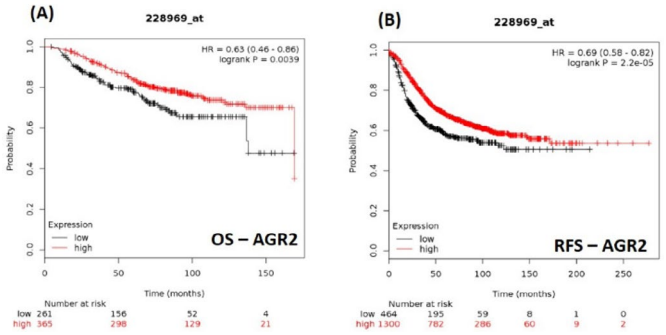
Material e Métodos

Tratou-se de um estudo ecológico, descritivo, de natureza quanti-qualitativa, realizado em 2021, que apresenta o valor prognóstico dos genes AGR2 e AGR3 em câncer de mama, realizado através de experimentação computacional, denominada análise in silico. Os dados coletados foram de natureza secundária, provenientes de bancos de dados genômicos, disponíveis para acesso da comunidade científica, através de páginas web. Os bancos de dados utilizados são de acesso público gratuito, dessa forma, não foi necessária a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para a realização do estudo. Os pacientes envolvidos não foram expostos e nem identificados.
Para analisar o impacto da expressão dos genes AGR2 e AGR3 no tempo de sobrevida global e de sobrevida livre de doença, nas pacientes com câncer de mama, foi utilizado o software Kaplan Meier Plotter (KMPlotter) disponível no link (www.kmplot.com). O Kaplan-Meier Plotter é uma plataforma que contém expressão gênica, dados clínicos e de sobrevivência de 5143 pacientes com câncer da mama. A integração dos dados de expressão gênica e dados clínicos ocorre simultaneamente através do servidor Postgre SQL. Na avaliação do valor prognóstico de um gene selecionado, a corte de pacientes foi dividida em dois grupos de acordo com a expressão gênica (alta e baixa expressão de mRNA do marcador de acordo com a mediana ou a média). As duas coortes de doentes foram plotadas e comparadas por gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier, onde foi calculada a razão de risco relativo com intervalos de confiança de 95% e valor de significância pelo teste de Log-Rank.

Resultados e Discussão

Na tumorigênese, o AGR2 desempenha um papel importante ativando as vias de sobrevivência e metástase, interagindo com a ciclina D1, catepsina B, D, Myc, p-Src e EGFR, e bloqueando a função p53 em inibir a morte celular (CHEVET et al., 2013; ALVES et al., 2018; MOIDU et al., 2020). Também desempenha um papel significativo na manutenção da homeostase do retículo endoplasmático (CHEVET et al., 2013; MOIDU et al., 2020). Além disso, semelhante a outras proteínas dissulfeto isomerase (LEE; LEE, 2017), um AGR2 extracelular é secretado na matriz extracelular e exibe ganho de função pró-oncogênica no microambiente tumoral (FESSART et al., 2016; MOIDU et al., 2020). Assim, o AGR2 altera o microambiente por meio de suas funções intracelulares e extracelulares (DELOM et al., 2018).
No contexto de microambiente tumoral, AGR2 pode desempenhar um papel importante nos processos de inflamação, imunogenicidade, remodelação da matriz extracelular e angiogênese. AGR2 induz à modulação de proteínas como fatores de crescimento e seus receptores associados, proteínas da matriz extracelular, como metaloproteases de matriz, fatores inflamatórios, integrinas, fatores imunogênicos ou fatores pró-angiogênicos (DELOM et al., 2018; DELOM et al., 2020).
Neste estudo, foi verificado que, considerando todos os pacientes com câncer de mama, ou seja, incluindo todos os subtipos moleculares de câncer de mama (Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo) a baixa expressão do AGR2 foi associada a pior sobrevida global (HR = 0,63 p = 0,0039) (Figura 1.A) e pior sobrevida livre de doença (HR = 0,69 p = 2,2e-5) (Figura 1.B).

Figura 1. Valor prognóstico do gene AGR2 no câncer de mama.



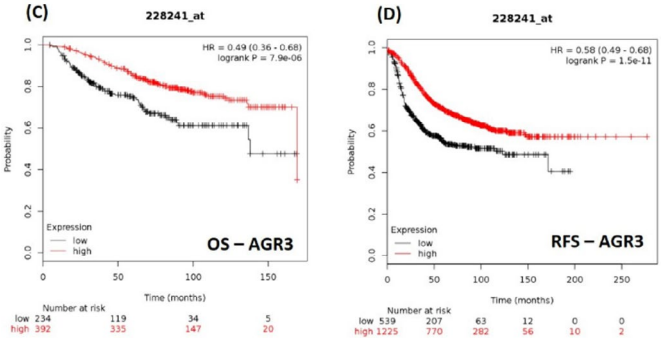
Legenda: OS: sobrevida global; RFS: sobrevida livre de doença. Em vermelho: pacientes com alta expressão e em preto, pacientes com baixa expressão de mRNA. Os dados foram extraídos usando o software Kaplan Meier plotter (KMPlotter) disponível no link (www.kmplot.com).

Muitos estudos indicaram que a alta expressão de AGR2 confere pior prognóstico considerando todos os subtipos moleculares de câncer de mama (GUO et al., 2017; FRITZCHE et al., 2006; BARRACLOUGH et al., 2009) e de pulmão (ALAVI et al., 2015). Porém, em câncer de ovário (ALVES et al., 2018) e colorretal (RIENER et al., 2014) a baixa expressão de AGR2 atribuiu pior sobrevida, resultando em polêmica. Semelhante aos nossos achados, Barraclough e colaboradores (2009) relataram que, após 20 anos de acompanhamento, apenas 26% dos pacientes com baixa expressão de AGR2 sobreviveram contra 96% daqueles com alta expressão de AGR2, mostrando diferença na sobrevida mediana de 68 e 216 meses, respectivamente. Outros estudos também não mostraram associação significativa entre a alta expressão do AGR2 em câncer de mama e a sobrevida global (GUO et al., 2017; HRSTKA et al., 2013). Contudo, outros autores demonstraram que a alta expressão de AGR2 no câncer de mama de grau 1 e 2 indicou menor sobrevida global (GUO et al., 2017; FRITZCHE et al., 2006). Estes autores sugeriram que a alta expressão de AGR2 no câncer de mama está fortemente associada a marcadores de diferenciação tumoral, como positividade para receptor de estrogênio (GUO et al., 2017; FRITZCHE et al., 2006). Ressaltamos que discordância entre os estudos pode ter sido gerada por diferenças metodológicas, como número da amostra e tempo de seguimento.

Adam e colaboradores (2003) mostraram que o AGR3 estava presente na maioria dos tumores de mama analisados, enquanto no tecido normal foi encontrado apenas no revestimento epitelial da mucosa do cólon. A proteína AGR3 também está envolvida em resposta a outros hormônios sexuais. No câncer de próstata, na comparação entre o tecido prostático maligno e amostras obtidas de pacientes com câncer de próstata após a castração cirúrgica, foi observada a alta expressão de AGR3 (VAARALA et al., 2012; BU et al., 2013).

Já em relação ao AGR3, esta pesquisa demonstrou que a baixa expressão desse gene também foi associada a pior sobrevida global (HR = 0,49 p = 7,9e-6) (Figura 2.C) e pior sobrevida livre de doença (HR = 0,58 p = 1,5e-11), quando analisamos a expressão desse gene em todos os subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo) (Figura 2.D).

Figura 2. Valor prognóstico dos genes AGR3 no câncer de mama.



Legenda: OS: sobrevida global; RFS: sobrevida livre de doença. Em vermelho: pacientes com alta expressão e em preto, pacientes com baixa expressão de mRNA. Os dados foram extraídos usando o software Kaplan Meier plotter (KMPlotter) disponível no link (www.kmplot.com).

O papel do AGR3 na sobrevida também é complexo e controverso. Semelhante aos nossos achados, um estudo avaliou o valor prognóstico do AGR3 em uma coorte de 129 carcinomas primários de mama. A alta expressão de AGR3 foi associada a maior sobrevida livre de doença, sendo que tumores de baixo grau histológico mostrou sobrevida livre de doença e sobrevida global mais longas (OBACZ et al., 2015). Além disso, em câncer de ovário, a alta expressão de AGR3 previu um melhor resultado no subgrupo de pacientes com tumores bem diferenciados (KING et al., 2011). Outros estudos descreveram o AGR3 como um oncogene (GRAY et al., 2012; CHI et al., 2020), sendo que o aumento do AGR3 foi associado a pior prognóstico no câncer colorretal (CHI et al., 2020). Diferentemente do encontrado nesta pesquisa, um estudo avaliou a expressão do AGR3 em 330 pacientes com um tempo de acompanhamento de 140 meses, e verificou que a alta expressão de AGR3 conferiu menor sobrevi-

da global e sobrevida livre de doença do que o grupo de baixa expressão de AGR3 (XU et al., 2019).

Conclusão

Usando dados do Kaplan-Meier Plotter com mais de 10 anos de acompanhamento, observamos que a expressão de AGR2 e AGR3 tem valor prognóstico no câncer de mama e, considerando todos os pacientes (Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo), a baixa expressão de AGR2 e AGR3 foi associada a pior sobrevida global e sobrevida livre de doença. Diante destes achados, este estudo sugere que as proteínas dissulfeto isomerase podem auxiliar na tomada de decisões na previsão de diagnóstico e no tratamento, contribuindo para a melhoria da sobrevida global e sobrevida livre de doença das pacientes acometidas por câncer de mama. Todavia, devido ao fato de nossos achados serem oriundos de um estudo in silico, recomenda-se estudos in vitro e in vivo, para confirmação dos mesmos, pois a compreensão adequada, das funções desses genes, seria inevitável para o desenvolvimento e elaboração de ferramentas de previsão prognóstica.

Agradecimentos

Ao Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde (PIVIC/UniRV) pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento deste projeto, bem como a Universidade de Rio Verde pela infraestrutura que permitiu a condução desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

ADAM, P. J. et al. Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 6482–6489, 2003.

ALAVI, M. et al. High expression of AGR2 in lung cancer is predictive of poor survival. **BMC Cancer**, v. 15, n. 655, 2015.

ALVES, M. R. et al. Downregulation of AGR2, p21, and cyclin D and alterations in p53 function were associated with tumor progression and chemotherapy resistance in epithelial ovarian carcinoma. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 7, p. 3188–3199, 2018.

BARRACLOUGH, D. L. et al. The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 5, p. 1848–1857, 2009.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BU, H. et al. Anterior gradient 2 and 3 - Two prototype androgen-responsive genes transcriptionally upregulated by androgens and by oestrogens in prostate cancer cells. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 5, p. 1249–1266, 2013.

CHEVET, E. et al. Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development. **Oncogene**, v. 32, n. 20, p. 2499–2509, 2013.

CHI, J. AGR3 promotes the stemness of colorectal cancer via modulating Wnt/β-catenin signalling. **Cell Signal**, v. 65, 2020.

COOPER, L. A. D. et al. PanCancer insights from *The Cancer Genome Atlas*: the pathologist's perspective. **Jounal pf Pathology**, v. 244, n. 5, p. 512-524. 2018.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 6, p. 438-451, 2019.

DELOM, F.; NAZARALIYEV, A.; FESSART, D. The role of protein disulphide isomerase AGR2 in the tumour niche. **Biology of the Cell**, v. 110, n. 12, p. 1–27, 2018.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, New York, v. 144, n. 8, p. 1941- 1953, 2019.

FESSART, D. et al. Secretion of protein disulphide isomerase AGR2 confers tumorigenic properties. **ELife**, v. 5, p. 1–24, 2016.

FRITZSCHE, F. R. et al. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 6, p. 1728–1734, 2006.

FESSART, D. et al. Secretion of protein disulphide isomerase *AGR2* confers tumorigenic properties. **ELife**, v. 5, p. 1–24, 2016.

GRAY, T. A. et al. Anterior Gradient-3: A novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models. **Journal of Immunological Methods**, v. 378, n. 1–2, p. 20–32, 2012.

GUO, J.; GONG, G.; ZHANG, B. Identification and prognostic value of anterior gradient protein 2 expression in breast cancer based on tissue microarray. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, p. 1-9, 2017.

HRSTKA, R. et al. AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. **Disease Markers**, v. 35, n. 4, p. 207-212, 2013.

KING, E. R. et al. The anterior gradient homolog 3 (AGR3) gene is associated with differentiation and survival in ovarian cancer. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 35, n. 6, p. 904–912, 2011.

LEE, E.; LEE, D. H. Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. **BMB Reports**, v. 50, n. 8, p. 401–410, 2017.

MATSUSAKI, M. et al. The Protein Disulfide Isomerase Family: from proteostasis to pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1864, n. 2, 2020.

MOIDU, N. A. et al. Secretion of pro-oncogenic AGR2 protein in cancer. **Heliyon**, v.6, n.9, 2020.

OBACZ, J. et al. Anterior gradient protein 3 is associated with less aggressive tumors and better outcome of breast cancer patients. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 1523-1232, 2015.

RIENER, M-O. et al. Loss of Anterior Gradient-2 expression is an independent prognostic factor in colorectal carcinomas. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 10, p. 1722-1730, 2014.

VAARALA, M. H. et al. Identification of androgen--regulated genes in human prostate. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 3, p. 466–472, 2012.

XU, Q. et al. Anterior Gradient 3 Promotes Breast Cancer Development and Chemotherapy Response. **Cancer Res Treat**, v. 52, n. 1, p. 218-245, 2020.

WANG, L.; YU, J.; WANG, C-C. Protein disulfide isomerase is regulated in multiple ways: Consequences for conformation, activities, and pathophysiological functions. **BioEssays**, p. 1-13, 2020.

WANG, Z.; JESEN, M. A.; ZENKLUSEN, J. C. A Practical Guide to *The Cancer Genome Atlas* (*TCGA*). *In* MATHÉ, E.; DAVIS, S. **Statistical Genomics. Methods in Molecular Biology**, v. 1418. New York. Humana Press, 2016, p. 111-141.