

A INTERAÇÃO ENTRE A UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO E O HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS, NA PESQUISA TRANSLACIONAL BÁSICO-CLÍNICA SOBRE A PROGRESSÃO TUMORAL

Recebido em 04/09/2015

Aceito para publicação em 10/09/2015

1ºTen (RM2-Md) Maria Alice Fusco de Souza ¹
CF (Md) Marcelo Leal Gregório ²
CF (Md) Ana Lucia Botelho Guimarães Arêas ³
CT (S) Miguel Fontes Domingues ⁴
3ºSG-PC Verônica de Andrade Coelho da Silva ⁵
Eliene Oliveira Kozlowski de Farias ⁶
Mauro Sérgio Gonçalves Pavão ⁷

RESUMO

O presente artigo apresenta a parceria científica entre o Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqMLM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD). Mais especificamente, são descritas as linhas de pesquisa relacionadas à progressão tumoral em bases moleculares pertencentes ao IBqMLM e os próximos passos a serem desenvolvidos no IPB por meio de análises *in vitro* e *in vivo* visando, num futuro próximo, a utilização das descobertas científicas no campo da prática clínica. A parceria IPB / IBqMLM reflete o princípio da pesquisa translacional, em que os achados laboratoriais são traduzidos em novas práticas médicas tendo como objetivo final a prevenção, o diagnóstico e o tratamento das doenças.

Palavras-chave: Pesquisa médica translacional; Metástase neoplásica; Urocordados; Transição epitelial-mesenquimal; Manganês.

INTRODUÇÃO

Em um contexto geral, pesquisa translacional é o processo de tornar observações obtidas no laboratório, na clínica e na comunidade em intervenções que melhorem a saúde de indivíduos e do público – desde o diagnóstico e a terapêutica até os procedimentos médicos (segundo o Centro Nacional de Avanços em Pesquisa Translacional, do NIH-USA). No entanto, do ponto de vista básico-clínico, a pesquisa translacional pode contemplar três etapas: o estudo das bases moleculares envolvidas em uma determinada doença por meio de experimentos *in vitro*; os estudos pré-clínicos, onde as bases moleculares investigadas *in vitro* são avaliadas em modelos experimentais em animais, *in vivo*; e os estudos clínicos, onde as bases moleculares de doenças, investigadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, são testadas em seres humanos.¹

Do ponto de vista operacional, a pesquisa translacional deve contar com a participação de pesquisadores da área biomédica com sólida formação básica-molecular; que venham de uma instituição que ofereça uma infraestrutura de pesquisa básica; instituição esta que, por sua vez, tenha uma estrutura profissional multidisciplinar da área clínica com interesse em pesquisa; e, finalmente, uma infraestrutura assistencial adequada, um banco de dados de seus pacientes e um banco de amostras de tecidos (importante principalmente em estudos retrospectivos).²

¹ Médica Veterinária. Doutora em Ciências pela Faculdade de Medicina – UFRJ. Ajudante da Seção de Cirurgia Experimental do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias. E-mail: alicefusco@hnmd.mar.mil.br

² Médico. Especialização Observership pela Cleveland Clinic Florida, USA. Encarregado do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

³ Médica. Chefe do Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias.

⁴ Farmacêutico. Assistente do Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias.

⁵ Farmacêutica. Supervisora do Setor de Histotecnologia do Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias.

⁶ Professora Visitante do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde - UFRJ.

⁷ Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde - UFRJ.

O modelo de interação Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias e o Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para exemplificar um modelo de parceria institucional de pesquisa translacional, em um contexto de pesquisa básico-clínica, descrevemos de forma mais detalhada, a parceria entre o Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e o Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqMLM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A interação entre IPB-HNMD/IBqMLM-UFRJ fornece todos os elementos necessários ao desenvolvimento de estudos translacionais básico clínicos, uma vez que o seu conjunto tem permitido: o estudo das bases moleculares de doenças; a identificação de moléculas alvo; a identificação de novos agentes terapêuticos; a comprovação do conceito básico pela prática através do desenvolvimento dos estudos clínicos retrospectivos e prospectivos em pacientes.

Nesta interação, os pesquisadores do IBqMLM-UFRJ apresentaram ao IPB a hipótese sobre o mecanismo molecular de progressão tumoral de carcinomas, fruto do trabalho de pesquisa básica desenvolvido durante a realização de um projeto de mestrado, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica da UFRJ. Juntamente com pesquisadores do IBqMLM-UFRJ, pesquisadores do IPB e médicos do Serviço de Patologia Clínica do HNMD, envolvendo profissionais de diferentes expertises, desenharam dois estudos clínicos translacionais: um estudo retrospectivo e outro prospectivo, que foram submetidos à avaliação e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HNMD. Esta característica multidisciplinar é de fundamental importância à pesquisa translacional.

Bases moleculares da progressão tumoral

A doença metastática é a responsável por mais de 95% dos óbitos dos pacientes com câncer e está relacionada com a progressão tumoral. A complexidade do fenômeno é evidente, envolvendo vários mecanismos moleculares e celulares que ocorrem no tumor primário, no sítio pré-metastático e no interior do vaso, na corrente sanguínea.³

Em todos os sítios presentes na progressão tumoral existe uma interação dinâmica e complexa entre o microambiente e as células tumorais. Assim, no tumor primário, o fenômeno mais importante é a transição do fenótipo epitelial das células tumorais para o fenótipo mesenquimal. Este novo fenótipo confere à célula a capacidade de migrar pelo tecido e alcançar o vaso sanguíneo. No sítio metastático, ocorre o fenômeno oposto, ou seja, a transição do fenótipo mesenquimal das células tumorais para o epitelial, que permite com que o tumor se estabeleça e cresça. Já os fenômenos que acontecem no interior do vaso permitem a sobrevivência das células tumorais e a colonização de órgãos distantes. Conjuntamente, estes são denominados de metástase hematogênea e será um dos focos deste artigo.⁴

As moléculas de importância para a sobrevivência da célula tumoral no interior do vaso são a mucina e a P-selectina, moléculas de adesão celular. A mucina está presente em grande quantidade na superfície das células tumorais, enquanto que a P-selectina é expressa na superfície de plaquetas ativadas. A interação da célula tumoral com a plaqueta no interior do vaso é mediado pela ligação da P-selectina da plaqueta e a mucina da célula tu-

moral. O complexo célula tumoral-plaqueta é importante para a sobrevivência da célula tumoral na corrente sanguínea durante a metástase.⁵

O efeito anti-P-selectina da heparina

A heparina é um composto natural obtido de mucosa intestinal suína, usado como anticoagulante principalmente na prevenção da trombose venosa. No entanto foi mostrado que a heparina comercial é também capaz de inibir a ligação de P-selectina à mucina e consequentemente a formação do complexo célula tumoral-plaqueta. A dinâmica dos eventos envolvidos na formação da metástase hematogênica é observada na (Figura 1). Células tumorais no tumor primário sofrem transição epitélio-mesenquimal e adquirem capacidade de migrar e penetrar no vaso. No interior do vaso, as células tumorais formam rapidamente um complexo com as plaquetas ativadas, impedindo a ação das células do sistema imune, as células NK (Natural Killer), proporcionando a sobrevivência das células tumorais no vaso durante a metástase e a formação de um tumor em um sítio secundário.⁵

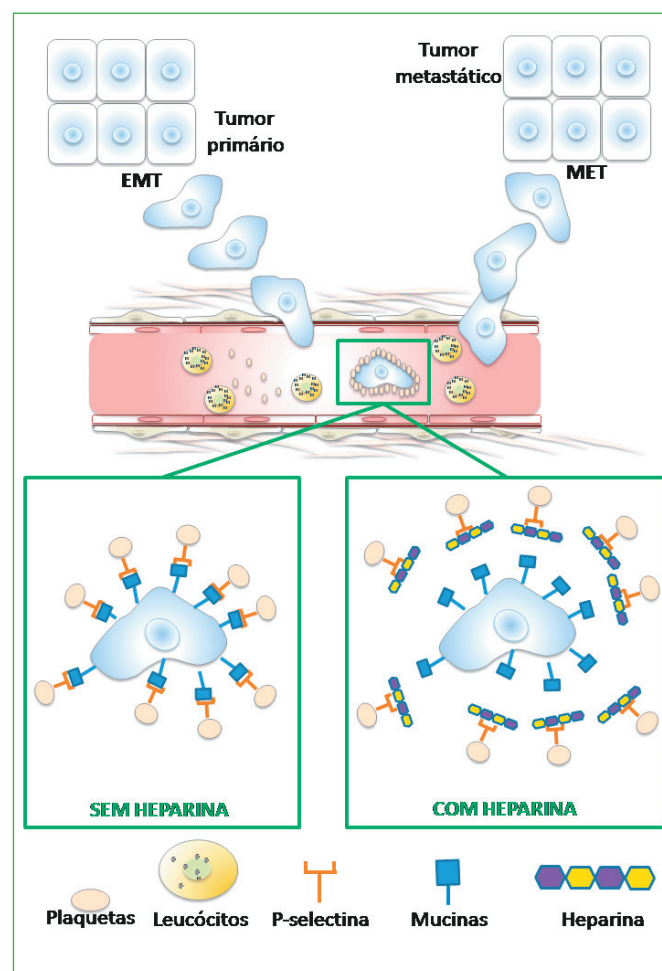


Figura 1: O efeito anti-P-selectina da heparina. Durante a metástase, células tumorais invadem a corrente sanguínea e, lá, interagem com plaquetas, que formam uma capa protetora, promovendo a evasão do sistema imune durante seu trânsito pela corrente sanguínea. Esta interação ocorre entre a P-selectina de plaquetas e as mucinas presentes na superfície de células tumorais (inserto A). A heparina liga-se à P-selectina e impede sua interação com seus ligantes como as mucinas de células tumorais (inserto B).

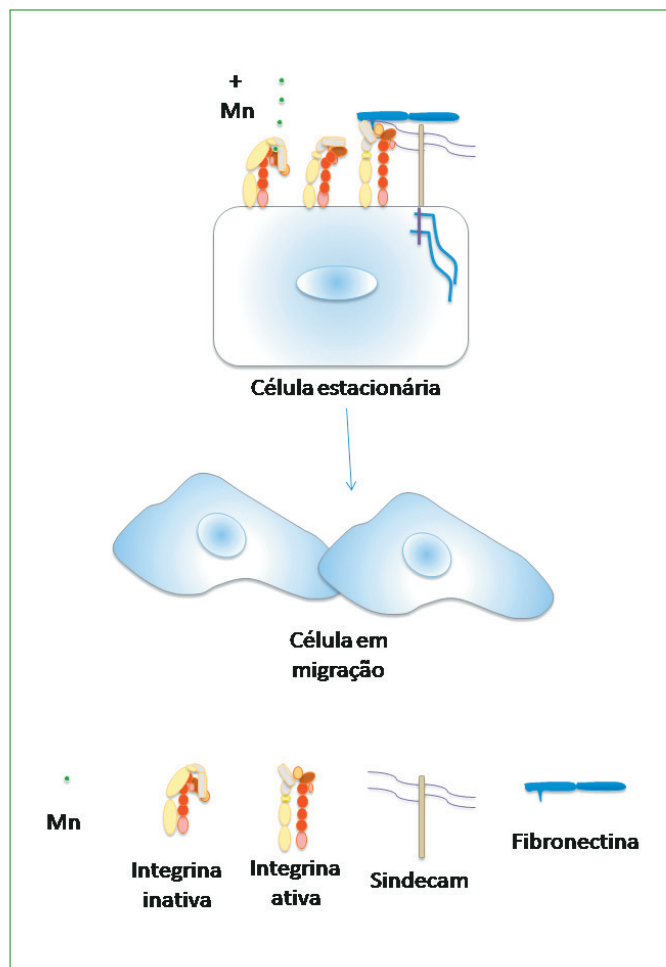


Figura 2: Manganês (Mn^{2+}) e migração celular. A interação do Mn^{2+} com integrinas, expressas na superfície de uma célula estacionária, leva à mudança conformacional destas proteínas de adesão, ativando-as para a interação com seu ligante presente na matriz extracelular, a fibronectina. A formação de um complexo ternário entre integrina ativada, fibronectina e sindecan, um proteoglicano de superfície celular, tem grande importância na migração celular.

Será que a heparina utilizada atualmente na clínica é uma boa opção terapêutica no combate à progressão tumoral? Para responder a esta questão, dois pontos precisam ser considerados:

1- os efeitos anticoagulante e antimetastático possuem mecanismos diferentes: a ativação da antitrombina e a inibição da P-selectina, respectivamente;

2- o elevado risco de hemorragia associado ao tratamento com heparina.

Evidentemente, uma excelente droga antimetastática, neste contexto, deveria possuir uma elevada atividade anti-P-selectina e uma

baixa ou inexistente atividade anticoagulante. Portanto, qual seria uma alternativa adequada para uma droga antimetastática? Se quiséssemos manter a natureza glicídica desta droga, e considerando o uso frequente da heparina, poderíamos concluir que análogos de heparina com elevada atividade anti-selectina, mas desprovida de efeito anticoagulante, seria uma droga com potencial utilização terapêutica no tratamento da metástase.

Análogos de heparina de invertebrados marinhos

Os oceanos representam cerca de 70% da superfície do planeta Terra e abriga organismos extremamente diversos, com espécies de quase todos os grupos de animais, incluindo alguns filos exclusivamente marinhos. O censo da vida marinha (<http://www.coml.org/census>) coordenado pelo The Consortium for Ocean Leadership in Washington DC, USA, estima que cerca de 230.000 espécies de animais marinhos tenham sido descritas. Durante o curso da evolução, os animais marinhos tem se adaptado às condições ambientais adversas, como elevada concentração de sais, temperaturas extremas, alta pressão, e baixa concentração de nutrientes e oxigênio. Como resultado, moléculas biológicas com características estruturais únicas, não encontradas nos seus correspondentes terrestres são sintetizadas, representando um enorme potencial de utilização em diferentes aplicações biotecnológicas na indústria e na medicina.⁷ Dessa forma, além dos metabólitos secundários, que constituem a força motriz na área dos produtos naturais,⁸ os invertebrados marinhos também sintetizam macromoléculas, entre elas polissacarídeos sulfatados, com estrutura semelhante à heparina de mamíferos, porém com diferentes padrões de sulfatação.

A busca por análogos de heparina com atividade biológica em invertebrados marinhos é uma atividade prospectiva recente que tem produzido uma enorme quantidade de bibliografia e que vem revelando novas moléculas com atividades biológicas diversas, como anticoagulante, antiviral, antitumoral, atividade de crescimento neuronal, entre outras (Tabela 1).

O Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Glicoconjugados do IBqMLM-UFRJ identificou, em invertebrados marinhos urocordados coletados durante a Operação Antártica XXXII, a bordo do Navio Polar Maximiano, análogos de heparina com elevada atividade anti-P-selectina, baixa atividade anticoagulante e efeito hemorrágico desprezível. Por exemplo, análogos de heparina do tipo dermatam sulfato, são potentes inibidores da P-selectina e como consequência, previnem a interação células tumorais-plaquetas e atenuam drasticamente a metástase tumoral. Estas moléculas possuem baixa atividade anticoagulante e não induzem sangramento quando administrados por via intravenosa.⁹ Concluindo, os análogos de heparina de invertebrados inibem a P-selectina e a formação do complexo célula tumoral-plaquetas no interior do vaso sanguíneo e atenuam a metástase de carcinomas.

Este achado possui uma enorme significância clínica, como pode ser observado nos vários ensaios clínicos desenhados para estudar o efeito anticâncer de análogos de heparina, registrados no US National Institute of Health database <http://www.clinicaltrials.gov/> e US Clinical Trials Register <http://www.clinicaltrialsregister.eu/> em setembro de 2012.

No Instituto de Pesquisas Biomédicas os análogos de heparina

Tabela 1: Atividades biológicas de análogos de heparina de invertebrados marinhos.

Espécie	Análogo de heparina	Atividade biológica
<i>Tachypleustridentatus</i>	Condroitim sulfato supersulfatado	Atividade neuritogênica
<i>Loligosp</i>	Condroitim sulfato supersulfatado	Atividade inibitória do crescimento neuronal; Atividade inibitória de P- e L-selectina; Atividade de indução do crescimento neuronal; Atividade de inibição da infecção do vírus da Herpes
<i>Holothuriagrisea</i> (<i>Ludwigothureagrisea</i>)	Condroitim sulfato supersulfatado	Atividade antitrombótica e anticoagulante; Atividade inibitória de P- e L-selectina; Atividade antimetastática; Atividade de indução da angiogênese
<i>Halocynthiapyriformis</i>	Condroitim sulfato supersulfatado	Atividade anticoagulante
<i>Styela clava</i>	Condroitim sulfato	Atividade anti-inflamatória
<i>Penaeus brasiliensis</i>	Heparina de baixo peso molecular	Atividade antitrombótica e anticoagulante
<i>Litopenaeusvannamei</i>	Heparina	Atividade anticoagulante; Atividade anti-inflamatória
<i>Katelsysia opima</i>	heparina-“like”	Elevada atividade anticoagulante
<i>Nodipectennodosus</i>	heparina-“like”	Atividade anticoagulante; Atividade antitrombótica, Atividade anti-inflamatória; Atividade antimetastática

previamente extraídos das ascídias estão sendo identificados e mais estudos *in vitro*, além de estudos pré-clínicos *in vivo*, têm sido realizados no intuito de comprovar as hipóteses levantadas com os estudos em nível molecular.

O manganês e a migração celular

O fenômeno da migração celular é bastante complexo e envolve a interação de moléculas de adesão localizadas tanto na superfície da célula quanto na matriz extracelular. Estas moléculas são: a integrina, molécula de adesão presente na superfície, responsável pela interação da célula com a matriz; o proteoglicano de sindecam, um análogo de heparina de superfície celular; a fibronectina, uma molécula de matriz; e o elemento manganês.

Como estas moléculas se relacionam na migração celular? Na presença de manganês, a integrina sofre uma mudança conformacional, tornando-se ativa e permitindo sua interação com a fibronectina da matriz que, por sua vez, requer o sindecam na superfície celular (Figura 2). Este complexo ternário, induzido pelo manganês permite uma reorganização do citoesqueleto celular, permitindo a migração.¹⁰ Dados preliminares, não publicados, indicam que, na presença de manganês, as células tumorais migram de maneira muito mais rápida. Interessantemente, observa-se que a adição de heparina reverte o efeito indutor da migração produzido pelo manganês. Acreditamos que este efeito inibitório da heparina seja resultado do sequestro do manganês extracelular, impedindo sua interação com a integrina.

Para comprovação do papel do elemento manganês no aumento

da migração das células tumorais e consequentemente na formação da metástase, cortes histológicos de tecidos de pacientes com câncer de colón mantidos no Serviço de Patologia do HNMD têm sido analisados e relacionados com o estadiamento da doença. A confirmação desta hipótese pode gerar a inclusão da pesquisa do manganês em material de biópsia como fator preditivo da formação de metástase.

DISCUSSÃO

As pesquisas sobre o câncer em nível molecular e celular desenvolvidas no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro são reconhecidas por meio de suas publicações em revistas científicas de grande impacto na comunidade científica internacional. Entretanto, a relevância da pesquisa se justifica quando suas descobertas, em última análise, são traduzidas em benefícios para a saúde do ser humano. É por isso que a interação da pesquisa básica da UFRJ consolida-se com a parceria que se apresenta com o Hospital Naval Marcílio Dias, por meio do Instituto de Pesquisas Biomédicas. A eficiência do Hospital no registro e manutenção dos dados de seus pacientes e o banco de amostras de tecidos permite que estudos retrospectivos sejam realizados para a comprovação dos dados obtidos *in vitro* e *in vivo* com animais de experimentação. As observações obtidas de estudos retrospectivos permitem então a realização de estudos clínicos prospectivos em pacientes atendidos no HNMD, após autorização dos mesmos. Tudo isso se traduz em elevação da excelência no atendimento, com a introdução de novas possibilidades ao arsenal terapêutico.



CONCLUSÃO

A pesquisa translacional em saúde nasceu da necessidade de uma maior interação entre laboratório e clínica. Os achados observados em nível molecular apresentam continuidade quando os mesmos são testados e comprovados na prática médica. Neste contexto, a interação entre o IPB-HNMD e o IBqMLM-UFRJ traduz o conceito de Pesquisa Translacional Básico-Clinica ao aliar pesquisadores de diferentes áreas envolvidos desde o laboratório até a clínica médica na busca pela melhoria da saúde dos seres humanos.

REFERÊNCIAS

1. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA*. 2008; 299(2):211-3.
2. Collins FS. Reengineering translational science: The time is right. *Sci Transl Med*. 2011 jul 6;3(90):90cm17
3. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial to mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
4. Kozłowski EO, Pavão MSG. Effect of sulfated glycosaminoglycans on tumor invasion and metastasis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1807-15.
5. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can evolve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metas-

tasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(4):2193-8.

6. Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P-selectin and L-selectin, but non-anticoagulant heparin can have additional effects. *Thromb Res*. 2007;120(Suppl2):S107-11.

7. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003;8(12):536-44.

8. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Discov*. 2009;8(1):69-85.

9. Kozłowski EO, Pavão MS, Borsig L. Ascidian dermatans sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1807-15.

10. Hopkinson SB, Hamill KJ, Wu Y, Eisenberg JL, Hiroyasu S, Jones JCR. Focal contact and hemidesmosomal proteins in keratinocyte migration and wound repair. *Adv Wound Care*. 2014 Mar 1;3(3):247-63.

Como citar este artigo: Souza MAF, Gregório ML, Arêas ALBG, Domingues MF, Silva VAC, Farias EOK, Pavão MSG. A interação entre o Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, da UFRJ e o Instituto de Pesquisas Biomédicas, do Hospital Naval Marcílio Dias, na pesquisa translacional básico-clínica sobre a progressão tumoral. *Arq Bras Med Naval*. 2015 jan/dez;76(1):54-58.

INTERACTION BETWEEN THE FEDERAL UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO AND MARCÍLIO DIAS NAVAL HOSPITAL IN THE BASIC-CLINICAL TRANSLATIONAL RESEARCH ON THE TUMOR PROGRESSION

Received on 9/4/2015

Accepted for publication on 9/10/2015

1°Ten (RM2-Md) Maria Alice Fusco de Souza ¹
CF (Md) Marcelo Leal Gregório ²
CF (Md) Ana Lucia Botelho Guimarães Arêas ³
CT (S) Miguel Fontes Domingues ⁴
3°SG-PC Verônica de Andrade Coelho da Silva ⁵
Eliene Oliveira Kozlowski de Farias ⁶
Mauro Sérgio Gonçalves Pavão ⁷

ABSTRACT

This paper presents the scientific partnership between the Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis (IBqMLM) of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and the Institute of Biomedical Research (IPB) of Marcilio Dias Naval Hospital (HNMD). More specifically, it describes the research lines of the IBqMLM related to the tumor progression in molecular basis as well as the next steps to be developed in IPB by *in vitro* and *in vivo* analysis targeting, in the near future, the use of scientific discoveries in the field of clinical practice. The partnership IPB/IBqMLM reflects the principle of translational research which the laboratory findings are translated into new medical practices with the ultimate goal of prevention, diagnosis and treatment of diseases.

Keywords: *Translational medical research; Neoplasm metastasis; Urochordata; Epithelial-mesenchymal transition; Manganese.*

INTRODUCTION

In a general context, translational research is the process of turning observations obtained in the laboratory, clinical and community into interventions that ultimately improve the health of individuals and the public-from diagnosis and therapeutics to the medical procedures (according to the "National Center for Advancing Translational Science" - NIH-USA). However, from the basic-clinical point of view, translational research can contemplate three phases: the study of the molecular basis involved in a particular disease through *in vitro* assays; preclinical studies, where in molecular bases *in vitro* investigated are evaluated using laboratory animal models, *in vivo*; and clinical studies, where in the molecular basis of diseases investigated through *in vitro* and *in vivo* assays are tested in humans.¹

From an operational point of view, translational research should include the participation of biomedical researchers with solid basic-molecular qualification; who came from a institution that offers a basic research infrastructure; institution that, in turn, has a multidisciplinary professional structure of physicians with research concerns; and finally, adequate healthcare infrastructure, a database of patients and a tissue bank of bio-samples (especially important when it comes to retrospective studies).²

¹ Veterinary Doctor. Doctor of Sciences, Faculty of Medicine - UFRJ. Experimental Surgery Section of helper Institute of Biomedical Research (IPB) of Marcilio Dias Naval Hospital. E-mail: alicefusco@hnmd.mar.mil.br

² Doctor. Specialization Observership the Cleveland Clinic Florida, USA. Responsible for the Institute of Biomedical Research (IPB) of Marcilio Dias Naval Hospital.

³ Doctor. Head of the Pathology Department of Marcilio Dias the Naval Hospital.

⁴ Pharmacist. Pathology Department assistant Marcilio Dias Naval Hospital.

⁵ Pharmacist. Supervisory Sector Histotecnologia of Pathology Department of Marcilio Dias Naval Hospital.

⁶ Visiting Professor at the Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Health Sciences Center - UFRJ.

⁷ Associate Professor at the Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Health Sciences Center - UFRJ.

The interaction model between The Institute of Biomedical Research of the Marcílio Dias Naval Hospital and the Medical Biochemistry Institute of the Federal University of Rio de Janeiro

In order to illustrate an institutional translational research partnership model in a basic-clinical research context, we describe here in more details the partnership between the Institute of Biomedical Research (IPB) of the Marcílio Dias Naval Hospital (HNMD) and the Institute of Medical Biochemistry (IBqM) of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ).

The interaction between the IPB-HNMD/IBqM-UFRJ provides all necessary elements for the development of basic-clinical translational studies, once the congregation has allowed: the study of the molecular basis of diseases; the identification of target molecules; the identification of new therapeutic agents; the evidence of the basic concept by the practice through the development of retrospective and prospective clinical studies in patients.

In this interaction, researchers at the IBqM-UFRJ introduced to the IPB researchers the hypothesis about the molecular mechanism of the progression of carcinoma tumor, which is the result of a basic research developed during the preparation of a master project from the UFRJ Biological Chemistry Postgraduate Program. Together with IBqMLM-UFRJ researchers, the researchers at IPB as well as physicians at the Clinical Pathology of HNMD, which involved professionals from different areas of expertise (this multidisciplinary characteristic is of great importance to the translational research), two clinical translational studies were designed: a retrospective and a prospective study who underwent evaluation and approved by the Research Ethics Committee of HNMD.

Molecular basis of tumor progression

Metastatic disease is responsible for over 95% of patient cancer deaths and is associated with tumor progression. The complexity of the phenomenon is evident, encompassing many molecular and cellular mechanisms occurring in the primary tumor, in the pre-metastatic site and within the vessel, in the bloodstream.³

In all sites of the tumor progression, there is a dynamic and complex interaction between the microenvironment and the tumor cells. Thus, in the primary tumor, the most important phenomenon is the transition from epithelial phenotype of tumor cells to mesenchymal phenotype. This new phenotype gives to the cell the ability to migrate through the tissue and achieve the blood vessel. In metastatic site, the opposite phenomenon occurs, i.e. the transition from mesenchymal to epithelial phenotype of the tumor cells, allowing the tumor to set up and grow. On the other hand the phenomena that take place inside the vessel allow the survival of tumor cells and the colonization of distant organs. Together, these are known as hematogenous metastases and this theme will be one of the focuses of this article.⁴

The molecules of importance for the survival of the tumor cells inside the vessel are mucin and P-selectin cell adhesion molecules. Mucin molecule is present in large amount on the surface of tumor cells, where as P-selectin molecule is expressed on the surface of activated platelets. The interaction between tumor cell and platelets in the vessel is mediated by binding of the platelet P-selectin and

mucin tumor cell. The platelet-tumor cell complex is important for the survival of tumor cells into the blood stream during metastasis.⁵

The anti-P-selectin effect of heparin

Heparin is a natural compound obtained from the porcine intestinal mucosa, primarily used as an anticoagulant for the prevention of venous thrombosis.

However it has shown that commercial heparin is also able to inhibit binding of P-selectin to the mucin molecule and therefore, the formation of the tumor cell-platelet complex. The dynamic of events involved in the formation of hematogenous metastasis is observed in figure 1. Tumor cells in the primary tumor undergo epithelial-mesenchymal transition and then acquire the ability to migrate and penetrate into the vessel. In the vessel, tumor cells readily form a complex with activated platelets, preventing the action of immune cells, NK (natural killer) cells, providing the survival of tumor cells in the vessel during metastasis and the formation of a tumor at the secondary site.⁵

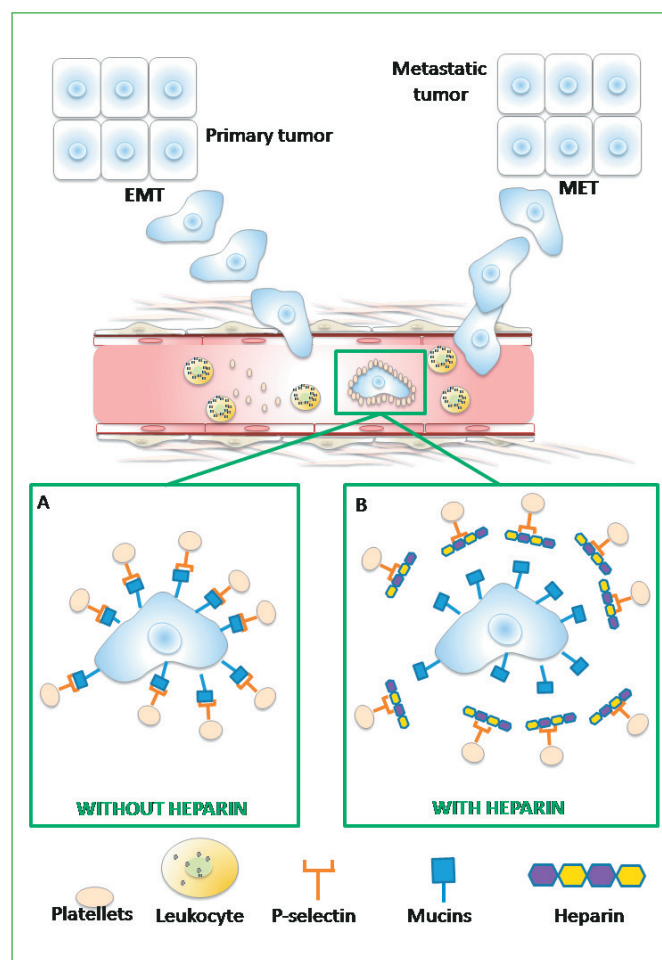


Figure 1: The anti-P-selectin effect of heparin. During metastasis, tumor cells invade the blood stream and once there, interact with platelets, which form a protective cover, promoting the evasion of the immune system during its flow into the bloodstream. This interaction occurs between P-selectin and mucin platelets on the surface of tumor cells (insert A). Heparin binds to P-selectin and prevents its interaction with its ligands such as tumor cell mucin (insert B).

In the presence of heparin, the interaction between P-selectin of platelets with mucins from the tumor cells is inhibited, preventing

the formation of the tumor cell-platelet complex, enabling the attack of NK cells to destroy tumor cells and preventing the formation of the secondary tumor site. As a result of inhibition of tumor cell-platelet complex, the phenomenon of metastasis is dramatically inhibited (Figure 2). Thus, heparin has a therapeutic effect on metastasis.⁶

Does heparin currently used in the clinical practice is a good therapeutic option in fighting the tumor progression? To answer this question two points need to be considered:

- 1- the anticoagulant and antimetastatic effects have different mechanisms: the activation of antithrombin and inhibition of P-selectin, respectively;
- 2- the high bleeding risk associated to treatment with heparin.

Clearly in this context, an excellent antimetastatic drug should have a high anti-P-selectin activity and low or no anticoagulant activity. So what would be a suitable alternative to an antimetastatic drug? If we wanted to keep glycidic nature of this drug, and considering the routinely use of heparin, one could conclude that heparin analogues

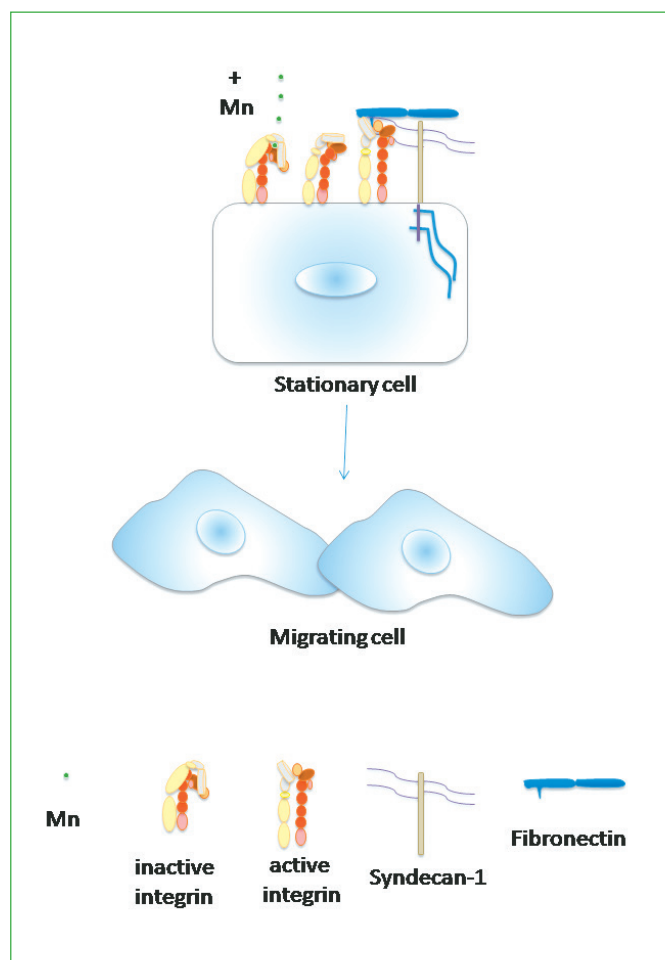


Figure 2: Manganese (Mn^{2+}) and cell migration. The interaction of integrins with Mn^{2+} expressed on the surface of a stationary cell leads to a conformational change of these adhesion proteins, enabling them to interact with their ligand present in the extracellular matrix, fibronectin. The formation of a ternary complex between activated integrin, fibronectin and syndecan, a cell surface proteoglycan, is of great importance in cell migration.

with high anti-selectin activity, but devoid of anticoagulant effect, would be a drug with potential therapeutic use in the treatment of metastasis.

Heparin analogues of marine invertebrates

Oceans account for about 70% of the surface of the Earth planet, and are also home of extremely diverse organisms, with species of almost all groups of animals, including some exclusively from the marine phyla. The Census of Marine Life (<http://www.coml.org/census>) coordinated by "The Consortium for Ocean Leadership in Washington DC, USA", estimates that about 230,000 species of marine animals have been described. During the course of evolution, marine animals have been adapted to adverse environmental conditions such as high concentration of salts, extreme temperatures, high pressure and low concentration of nutrients and oxygen. As a result, biological molecules with unique structural features, not found in their *terrestrial* matches are synthesized, counting for an enormous potential for use in different biotechnology applications in the industry as well as the clinical medicine.⁷ Thus, in addition to the secondary metabolites, which are the driving force in the field of natural products⁸, marine invertebrates also synthesize macromolecules, including sulfated polysaccharides, structure similar to the mammal heparin, but with different patterns of sulfation.

The search for heparin analogs with biological activity in marine invertebrates is a recent prospective activity, which has produced an enormous amount of literature and also has revealing new molecules with different biological activities such as anticoagulant, antiviral, anti-tumor, nerve growth activity, among others (Table 1).

The Laboratory of Biochemistry and Cell Biology Glycoconjugates of the IBqMLM-UFRJ has identified, in a diversity of urochordata marine invertebrates collected during Antarctica XXXII Operation aboard the Polar ship Maximiano, heparin analogues with high anti-P-selectin activity, low anticoagulant activity and low hemorrhagic effect. For example, the type dermatan sulfate heparin analogs are potent inhibitors of P-selectin and consequently, preventing the tumor cells-platelets interaction in a drastic way thus attenuating tumor metastasis. These molecules have low anticoagulant activity and do not induce bleeding when administered intravenously.⁹ In conclusion, the invertebrate heparin analogues: inhibit P-selectin and the formation of platelet-tumor cell complex in the blood vessels and attenuate the metastasis of carcinomas.

This finding has a tremendous clinical significance, being observed in several clinical trials designed to study the anti-cancer effect of heparin analogues, registered in the US National Institute of Health database <http://www.clinicaltrials.gov/> and US Clinical Trials Register <http://www.clinicaltrialsregister.eu/> in September 2012.

At the Institute of Biomedical Research heparin analogues previously extracted from sea squirts are being identified and more in vitro studies, as well as preclinical in vivo studies have been conducted in order to confirm the hypotheses raised with studies at the molecular level.

The manganese and cell migration

Cell migration is a very complex phenomenon and involves the interaction of adhesion molecules located both at the cell surface and extracellular matrix. These molecules include: integrin, adhesion molecule located on the surface, responsible for the interaction between the cell and the extracellular matrix; syndecan proteoglycan, an heparin analogue located on the cell surface; fibronectin, a matrix molecule; and manganese element.

Table 1: Biological activity of heparin analogs from marine invertebrates.

Species	Heparinanalogue	Biologicalactivity
<i>Tachypleustridentatus</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Neuritogenicactivity
<i>Loligosp</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Neuronal growth inhibitory activity; P- and L-selectininhibitoryactivity; Neuronal growthinductionactivity; Herpexvirus infection inhibitory activity
<i>Holothuriagrisea (Ludwigothureagrisea)</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Anticoagulantandantithromboticactivity; P- and L-selectininhibitoryactivity; Antimetastatic activity; Angiogenesis induction activity
<i>Halocynthiaapyriformis</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Anticoagulantactivity
<i>Styela clava</i>	Chondroitin sulfate	Antiinflammatoryactivity
<i>Penaeus brasiliensis</i>	Low molecular weightheparin	Anticoagulantandantithromboticactivity
<i>Litopenaeusvannamei</i>	Heparin	Anticoagulantactivity; Antiinflammatoryactivity
<i>Katelsia opima</i>	heparin-like	High antivcoagulantactivity
<i>Nodipectenodosus</i>	heparin-like	Anticoagulant andantithromboticactivity, Antiinflammatory activity; Antimetastatic activity

How do these molecules relate to each other during the cell migration? In the presence of manganese, integrin undergoes a conformational change to become active and allowing interaction with matrix fibronectin which, in turn, requires syndecan on the cell surface (Figure 2). This manganese-induced-ternary complex allows the reorganization of the cell cytoskeleton, enabling then the migration. 10 Unpublished preliminary data indicate that, in the presence of manganese, the tumor cells migrate in a faster way. Interestingly, it is observed that the addition of heparin reverses the effect of the migration inducer produced by manganese. We believe that this inhibitory effect of heparin may result from the extracellular manganese sequestration preventing its interaction with integrin.

In order to prove the role of manganese element in the increased migration of tumor cells and consequently the formation of metastases, histological sections of tissue kept in the HNMD Pathology Service from patients with colon cancer have been analyzed and related to the staging of the disease. Confirmation of this hypothesis can generate the inclusion of manganese search in biopsy material as a predictor of metastasis formation.

DISCUSSION

Research emphasis on the molecular and cellular basis of cancer developed in the Medical Biochemistry Institute of the Federal University of Rio de Janeiro are well recognized by the published papers in scientific journals of great impact among the international scientific community. However, the relevance of the research is justified when their findings ultimately translate into benefits for the health of human beings. That is why the interaction of basic research at UFRJ is consolidated with the partnership with the Marcilio Dias Naval Hospital, by the Institute of Biomedical Research. The efficacy of the Hospital in registering and maintaining the data of their patients as well as the tissue bank samples allow retrospective studies to be conducted for verification of the data obtained by in vitro and experimental animals in vivo tests. Observations obtained from retrospective studies then allow the realization of prospective clinical studies in patients treated at HNMD, after authorization thereof. These things together are translated into increased service excellence with the introduction of new possibilities to the therapeutic arsenal.

CONCLUSION

The translational research in health science arose from the need for a greater interaction between the laboratory and the clinics. The

findings observed at the molecular level have continuity when they are tested and proved in the medical practice. In this context, the interaction between the IPB-HNMD and IBqMLM-UFRJ translates the concept of Basic-Clinical Translational Research by combining researchers from different areas involved from the laboratory to the medical clinic in the search for the improvement of human welfare.

REFERENCES

1. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA*. 2008; 299(2):211-3.
2. Collins FS. Reengineering translational science: The time is right. *Sci Transl Med*. 2011 Jul 6;3(90):90cm17
3. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial to mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
4. Kozlowski EO, Pavão MSG. Effect of sulfated glycosaminoglycans on tumor invasion and metastasis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1807-15.
5. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can evolve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(4):2193-8.
6. Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P-selectin and L-selectin, but non-anticoagulant heparin scanhave additional effects. *Thromb Res*. 2007;120(Suppl2):S107-11.
7. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003;8(12):536-44.
8. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Discov*. 2009;8(1):69-85.
9. Kozlowski EO, Pavão MS, Borsig L. Ascidian dermatans sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1807-15.
10. Hopkinson SB, Hamill KJ, Wu Y, Eisenberg JL, Hiroyasu S, Jones JCR. Focal contact and hemidesmosomal proteins in keratinocyte migration and wound repair. *Adv Wound Care*. 2014 Mar 1;3(3):247-63.

How to cite this article: Souza MAF, Gregório ML, Arêas ALBG, Domingues MF, Silva VAC, Farias EOK, Pavão MSG. Interaction between the Federal University of Rio de Janeiro and Marcilio Dias Naval Hospital in the basic-clinical translational research on the tumor progression. *Arq Bras Med Naval*. 2015 Jan/Dec;76(1):59-62.