

Biologia molecular dos tumores do trato digestivo

Carlos F. Dillenborg¹, Luis Fernando Moreira¹

Uma revolução no entendimento da gênese do câncer humano vem acontecendo, e sua natureza fundamentalmente genética foi reconhecida. Os cânceres gastrointestinais apresentam alta incidência e prognóstico reservado na maioria dos casos quando da sua apresentação em nosso meio. Espera-se que a biologia molecular traga novos caminhos para o diagnóstico e tratamento mais efetivos. No nosso trabalho, são abordados os aspectos atuais da carcinogênese colorretal, esofágica e gástrica, bem como os genes e seus sub-produtos (proteínas) envolvidos. As implicações clínicas destes novos conhecimentos, como as aplicações no diagnóstico precoce, a existência de marcadores prognósticos e a possibilidade de novos tratamentos, são discutidos.

Unitermos: Biologia molecular, digestivo, gastrointestinais, tumores, carcinogênese, oncogênese.

The Molecular biology of gastrointestinal tumors

Remarkable improvements in the understanding of the development of human cancer and of its genetic nature have been reported. At our services, we have observed that there is a high incidence of gastrointestinal tumors in our region and, also, that poor prognosis occurs due to patients presenting with advanced stages of the disease. In this sense, it is expected that molecular biology studies will bring new hope for more effective diagnostic and treatment methods. Consequently, it is our objective to address the current aspects on colorectal, gastric, and esophageal carcinogenesis and the genes and products involved. The application of recent findings, used for early diagnosis, the existence of markers for prognosis, and the possibility of using new methods of treatment are discussed.

Key-words: Molecular biology, digestive system, gastrointestinal system, tumors, carcinogenesis, oncogenesis.

Revista HCPA 2001;21(1):59-70

Introdução

Nos últimos 15 anos, uma revolução aconteceu na compreensão da gênese do câncer humano. A natureza fundamentalmente

genética desta doença foi reconhecida e muitos dos genes envolvidos foram identificados (1-8). Não é exagero afirmar que o mecanismo geral do desenvolvimento do câncer já é conhecido, embora a maioria dos detalhes

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Dr. Carlos Frota Dillenborg, Rua Joaquim Nabuco 1732, CEP 93310-002, Novo Hamburgo, RS, Brasil. Fone: +55-51-9986.0979, +55-51-594.6922; e-mail: carlos.dillenborg@terra.com.br

permanença obscura. A maior parte destes conhecimentos derivou do estudo de modelos de sistemas virais, genéticos e da carcinogênese químico-induzida em animais. Recentemente, estes estudos estenderam-se aos sistemas cancerígenos humanos. Os tumores gastrointestinais provaram ser um eficiente modelo para o estudo do câncer humano de ocorrência espontânea (9).

Os tumores ocorrem reconhecidamente como resultado da alteração de múltiplos genes. O desenvolvimento do câncer se dá em estágios desde a célula normal, passando por vários tipos de lesões benignas, pelo carcinoma não-invasivo, até a doença invasiva metastática. Aceita-se que as alterações genéticas são as responsáveis pela progressão de estágio para estágio.

Este trabalho revisa os conhecimentos atuais sobre a influência das lesões moleculares no desenvolvimento destes tumores e discute as perspectivas atuais da utilização da biologia molecular como ferramenta diagnóstica e terapêutica nos principais tumores gastrointestinais.

Tumores gastrointestinais

Os cânceres gastrointestinais são responsáveis por grande parte dos tumores humanos. Eles são, quase sem exceção, incuráveis quando grandes metástases estão presentes. Um dos objetivos da identificação dos genes envolvidos no seu desenvolvimento é a esperança de que isto possa trazer novos caminhos para um tratamento mais efetivo.

O modelo de carcinogênese de múltiplos estágios sugere que múltiplos eventos genéticos são responsáveis pela tumorigênese, de forma seqüencial. Acredita-se que o estágio físico de desenvolvimento do tumor necessitaria refletir um estágio mutacional individual. A acessibilidade aos tecidos do trato digestivo e a hierarquia das lesões pré-malignas levaram ao estudo da progressão tumoral nestes tecidos, especialmente através do carcinoma colorretal.

Câncer colorretal

O estudo do câncer colorretal tem sido um dos elementos mais importantes para a

própria compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na gênese das neoplasias malignas. Isto se deve às características facilmente identificáveis de desenvolvimento destes tumores, aliado à existência da polipose adenomatosa familiar, a qual representa possivelmente o mais completo e explícito modelo de carcinogênese em todo o organismo humano (10).

É considerado o modelo humano ideal para a compreensão da carcinogênese devido a sua disponibilidade tecidual relativamente fácil, à existência de lesões precursoras e síndromes familiares claramente definidas (polipose adenomatosa familiar), além do avançado estágio de conhecimento de seu processo de carcinogênese (9).

Em conseqüência disto é imprescindível, para a compreensão das doenças neoplásicas, o estudo das alterações genéticas envolvidas no câncer colorretal, assim como suas repercussões sobre o ciclo celular no epitélio intestinal. Parece ser importante uma abordagem de alguns elementos básicos para que esta compreensão se dê de forma mais harmônica.

Revisão do ciclo celular do epitélio intestinal normal

O epitélio colorretal é formado por células organizadas na forma de criptas. Dentro destas criptas, desenvolve-se um ciclo de proliferação celular organizado de forma que as células primitivas, situadas junto à membrana basal ou "fundo" da cripta, sofrem um processo de diferenciação celular na medida em que ascendem em direção à superfície epitelial, onde irão assumir as funções de epitélio intestinal, como produção de muco, absorção e secreção entre outras (figura 1). Uma vez atingido o epitélio propriamente dito, estas células já diferenciadas passarão a manter contato direto com os elementos contidos na luz intestinal, estando sujeitas a agressões físicas e químicas, além de inflamatórias, infecciosas e traumáticas. A exposição permanente poderia induzir alterações no DNA celular, que poderiam ser transmitidas a sucessivas gerações de células resultantes de sua divisão mitótica. Para reduzir tais riscos, após um período de alguns dias, estas células

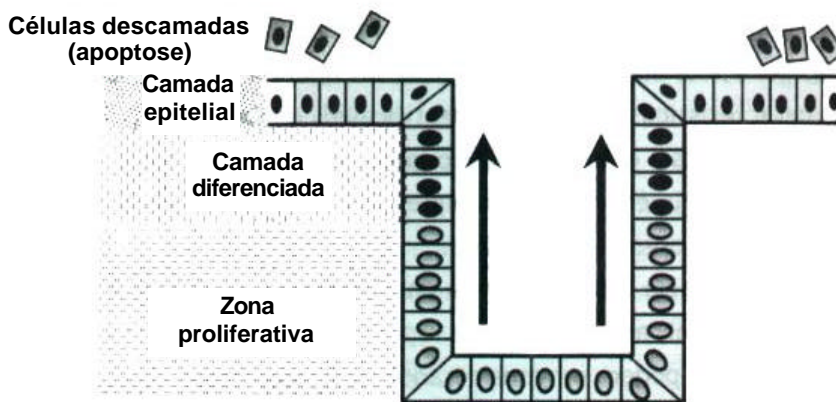


Figura 1. Ciclo celular do epitélio intestinal normal. Modificado de Rossi BN (53).

entram em um processo de morte celular programada, denominado apoptose, sendo assim eliminadas para a luz intestinal e posteriormente substituídas por outras células oriundas do processo de diferenciação na cripta intestinal. Esta série de eventos compõe o ciclo normal de proliferação do epitélio intestinal, que caracteriza-se pelo equilíbrio fisiológico entre a formação de novas células e morte daquelas já alteradas através da apoptose (10,11).

Outro fator de grande importância para a integridade do tecido epitelial é o mecanismo dinâmico de adesão entre as células. Esta adesão é

complexo protéico E-caderina-catenina (figura 2) (12,13). A E-caderina é uma proteína transmembrana, composta por segmentos extra e intracelulares. O segmento extracelular possui a função de estabelecer fixação à outra E-caderina da célula adjacente através de ligações cálcio-dependentes. A porção intracelular mantém-se fixa ao citoesqueleto através da proteína catenina, para manter assim a integridade tecidual.

Além da fixação entre as células, esta adesão celular é capaz de promover a sinalização entre elas. Este é um fator

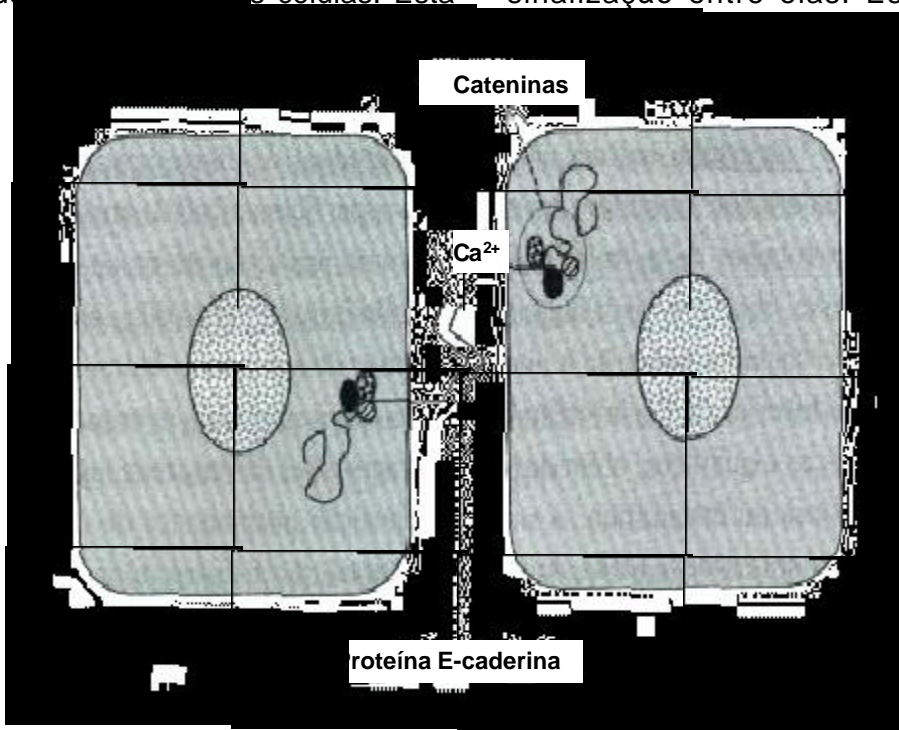


Figura 2. Adesão celular pelo complexo E-caderina - catenina. Modificado de Rossi BN (53).

Tabela 1. Proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal

Proteína	Função	Ação
APC	Supressão	Ação reguladora sobre a proliferação celular epitelial
K-ras	Estimulação (oncogene)	Transmissão membrana-núcleo de ativação do crescimento e diferenciação celular a partir de estímulos extra-celulares
DCC	Supressão	Ação na adesão celular, reduzindo o potencial metastático
p53	Supressão	Deteção de falhas no DNA da célula e bloqueio da divisão celular para que ocorra o reparo da lesão ou morte celular
Proteínas de reparo	Reparo	Remoção de segmentos alterados de DNA e inserção de um novo segmento, contendo a seqüência correta

divisão celulares, que são dependentes de estímulos oriundos de origens extracelulares. Para que o elo de informação seja completado, a transdução através do citoplasma de sinais oriundos da membrana celular é feita principalmente por um grupo de proteínas do grupo ras, como será exposto posteriormente. Qualquer anormalidade nesta comunicação membrana-núcleo poderá resultar em um desequilíbrio no ciclo celular epitelial (10).

Assim, para a manutenção do equilíbrio fisiológico do epitélio intestinal, é necessário, além da maturação celular e apoptose, que se mantenha íntegro o mecanismo de adesão entre as células (complexo E-caderina – catenina) e a comunicação membrana-núcleo funcionante (grupo ras). Alterações nestes eventos poderão ter como consequência o desenvolvimento de uma doença neoplásica (10).

Proteínas envolvidas na carcinogênese

O DNA celular herda uma série de genes capazes de gerar proteínas específicas, que irão atuar ao longo do ciclo da vida celular, garantindo a ocorrência da proliferação epitelial em condições fisiológicas ou suspendendo o processo em caso de anormalidades. Estas proteínas irão realizar, entre outras funções, o metabolismo intracelular e seu relacionamento

com as outras células e estruturas extracelulares. As alterações genéticas relacionadas ao câncer colorretal podem comprometer a formação destas proteínas, gerando alterações que poderão resultar no surgimento de uma neoplasia (14).

São apresentadas a seguir algumas das proteínas mais importantes envolvidas no ciclo epitelial e que freqüentemente relacionam-se à carcinogênese intestinal (estas proteínas estão resumidamente apresentadas na tabela 1):

- **Proteína APC (*adenomatous polyposis coli*)** - seu gene situa-se no cromossomo 5 e apresenta-se mutado em todos os casos de polipose adenomatosa familiar, daí derivando seu nome (10,15,16). Esta mutação do gene APC é a marca genética da polipose adenomatosa familiar e, sendo adquirida de forma hereditária, deve ser encontrada em todas as células do indivíduo. Esta mutação, e conseqüentemente seu produto (proteína APC), está também relacionada à gênese das neoplasias colorretais esporádicas em pelo menos 2/3 dos casos, compreendendo desde os pequenos adenomas até as neoplasias malignas mais avançadas (9,15). A incidência de mutações do gene APC aumenta em relação direta com a progressão do processo neoplásico. Alterações

da proteína APC são encontradas em cerca de 30% em pequenos adenomas tubulares e em mais de 80% dos casos de adenocarcinomas colorretais (10). Acredita-se hoje que a mutação do gene APC seja uma das etapas iniciais do processo seqüencial de mutações genéticas da carcinogênese. Não está definida a função da proteína APC. Sabe-se que está associada à concentração das proteínas intracelulares a e b-cateninas, as quais ligam-se as E-caderinas para adesão e comunicação intercelular, como anteriormente mencionado. Além disso, demonstrou-se que a proteína APC exerce uma função reguladora na proliferação epitelial através do bloqueio do ciclo celular entre a primeira fase de repouso (G1) e a fase de síntese protéica (S), levando a uma parada na produção de novas células (9,10).

- **Proteína K-ras** - faz parte de um grupo de proteínas ras, denominação oriunda do achado de mutações destas proteínas em sarcomas de ratos (RAr Sarcomas). Neste grupo, são identificados 3 subgrupos: N-ras, Harvey-ras (H-ras) e Kirsten-ras (K-ras), sendo este último mais freqüentemente citado devido ao seu envolvimento no surgimento dos tumores colorretais. Têm a função de realizar a transdução do sinal oriundo da membrana celular, através do citoplasma até o núcleo. Promovem a ativação do crescimento e diferenciação celular a partir de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônio, neurotransmissores, citoquinas, etc. (1,3,16-22). A importância desta função se deve à necessidade da célula de ajustar seu ciclo reprodutivo ao meio tecidual ao qual está inserida (10). Uma eventual mutação que torne esta proteína persistentemente ativada irá representar um estímulo permanente à proliferação celular. Por este motivo, o gene responsável pela produção da proteína k-ras, situado no cromossomo 12, é considerado um proto-oncogene, que ativado transforma-se em um oncogene (gene cuja ativação representa um estímulo ao desenvolvimento de neoplasias) (17). Alguns estudos têm demonstrado que mutações de k-ras estão presentes em cerca de 40-60% dos carcinomas colorretais ou adenomas maiores que 1 cm (16,21). Acredita-se que a ativação da proteína k-ras devido à

mutação gênica representa um passo precoce na formação de neoplasias colorretais, aumentando a incidência de mutações de acordo com a progressão do tamanho e grau da neoplasia, em especial na transição de adenomas pequenos para intermediários. Pode, no entanto, apresentar uma tendência a uma menor ativação em carcinomas em estágios mais avançados, para os quais aparentemente o estímulo ras torna-se menos importante (10).

- **Proteína DCC (*deleted in colorectal cancer*)**- presente também no sistema nervoso central e sistema reticuloendotelial. Sua descoberta, bem como seu nome, deve-se ao achado de que cerca de 70-80% dos carcinomas colorretais apresentam uma deleção do braço longo do cromossomo 18, onde se situa o gene DCC. Por isso, é considerado um gene supressor tumoral (23). A proteína DCC desempenha uma importante função relacionada à adesão celular, sendo uma proteína transmembrana (17). Ademais, uma significativa correlação entre a concentração tumoral do gene DCC e o prognóstico do paciente têm sido demonstrado (24,25). Shibata et al. (25) demonstraram que pacientes portadores de câncer colorretal em estágio II apresentaram sobrevida em 5 anos de 94,3% quando a proteína DCC estava presente no tecido tumoral, e de 61,6% quando a proteína não estava presente ($P < 0,001$). Em estágio III, os índices de sobrevida aos 5 anos foram de 59,3% e 33,2% respectivamente ($P = 0,03$). Embora outros autores questionem o verdadeiro papel da proteína DCC como elemento supressor tumoral, existe uma tendência a acreditar que a perda desta proteína possa comprometer seriamente a capacidade de adesão celular no câncer colorretal, favorecendo assim um maior potencial metastático (10).

- **Proteína p53 (guardiã do genoma)** - é a proteína de maior importância entre as proteínas envolvidas no processo carcinogênico. O gene p53 situa-se no braço curto do cromossomo 17 (17p). Mutações da proteína p53 são encontradas em cerca de 50%-70% de todos os cânceres humanos, e

em mais de 50 tipos diferentes, como os tumores da bexiga, cérebro, mama (40%), cérvix uterina, cólon e reto (70%), esôfago, laringe, fígado, pulmões (50%), ovários, pâncreas, próstata, pele, estômago e tireóide (2,3,9,10,21,25-34). Quando esta mutação é adquirida de forma hereditária, é responsável pela Síndrome de Li-Fraumeni, uma doença familiar cujos portadores irão desenvolver tumores malignos invasivos em 50% dos casos até os 30 anos e mais de 90% até os 70 anos de idade. A p53 possui a função de detectar as eventuais falhas existentes no DNA da célula prestes a se dividir e impedir que estas se propaguem à linhagem celular subsequente. Elevação da expressão de p53 resulta em parada do ciclo em G1 e apoptose subsequente se não foi possível reparar o dano detectado. A p53 também regula a transição G2/M do ciclo celular (9). Na fase de repouso (fase G1), iniciam-se eventos visando a duplicação de seu conjunto de 23 pares de cromossomos. No final desta fase, situa-se o ponto de controle habitual (*checkpoint*), momento em que a proteína p53 confere a integridade da duplicação cromossomal desenvolvida até aquele ponto. Segue-se uma fase de síntese (fase S), durante a qual se dá a duplicação do conjunto de 23 pares de cromossomos, passando a 46, visando à divisão celular posterior. Porém, antes que a divisão celular ocorra, a célula entra em novo período de repouso, a fase G2. Durante esta fase, a célula tetraplóide é preparada para a mitose, e novamente o DNA duplicado é conferido (segundo *checkpoint*) pela proteína p53, a fim de detectar eventuais defeitos ou mutações cromossômicas ocorridos durante a duplicação. Estas alterações podem ser causadas por fatores externos, como a exposição a drogas ou radiações, hipóxia, ou internamente, como falhas no próprio mecanismo mitótico. A proteína p53, uma vez identificado a existência de uma anormalidade no DNA da célula em divisão, promove uma parada do ciclo celular na fase G1S, durante a qual 2 caminhos poderão ser seguidos: o reparo da lesão no DNA (através das proteínas de reparo), ou a indução da morte celular através da apoptose. Por isso, o gene p53 é considerado um gene supressor de tumor e o guardião do genoma,

por preservar a duplicação errônea de um modelo (9,10,35). Existem hoje, comercialmente, dois métodos de detecção de níveis teciduais de proteína p53: 1) imunohistoquímica – obtém-se a visão direta, com o uso do microscópio, da quantidade de proteína p53 existente nas células, através de sua coloração por anticorpos específicos. Devido ao fato de a proteína p53 selvagem (ou não-mutada) possuir meia-vida curta, não é esta a forma visualizada no exame, e sim, é visualizada a proteína p53 na sua forma mutada, que não é normalmente metabolizada e, por esta razão, possui uma meia-vida mais longa; 2) reação em cadeia da polimerase (PCR) – pesquisa-se mutações no gene p53 após amplificação do DNA. É um método mais preciso, por analisar especificamente a sequência de pares de bases existentes no gene em questão. Devido a sua complexidade, sua utilização clínica é hoje ainda pouco viável, embora seja usado de forma rotineira em centros para estudos genéticos (10,17,28).

Em relação ao câncer colorretal, estuda-se atualmente a aplicabilidade clínica da proteína p53 no diagnóstico (4,26), tratamento (27) e prognóstico (28,30-33). Embora ainda existam controvérsias, tumores com elevada incidência de mutações na proteína p53 apresentam uma maior probabilidade de recidiva e menores índices de sobrevida.

- **Proteínas de reparo** - é um grupo de proteínas que realiza o reparo da alteração do DNA, após a intervenção da proteína p53 durante a fase G2. Foram descritos 5 genes até o momento: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6. Estas proteínas possuem a capacidade de remover um segmento de DNA contendo uma alteração na sequência de bases e inserir um novo segmento contendo a sequência correta, baseando-se na sequência existente na fita complementar do DNA. A falha no funcionamento destas proteínas irá causar uma grande instabilidade no genoma, ou seja, os defeitos na sequência de pares de base que ocorrem de forma aleatória na replicação do DNA deixam de ser reparados adequadamente, gerando um acúmulo de anormalidades genéticas que favorecem o surgimento do câncer (10).

• **Instabilidade de microssatélites, erros de replicação (RER)** - A molécula de DNA consiste em uma gigantesca seqüência de cerca de 3 bilhões de nucleotídeos (adenina, guanina, citosina, timina). Algumas seqüências irão formar as diferentes proteínas do organismo humano, enquanto que grandes segmentos do material genético não possuem uma função reconhecida até o momento. Além disso, existem seqüências que são encontradas de forma repetitiva (em até milhares de vezes) ao longo do genoma. Dentre estas, encontram-se as microssatélites, que são pequenas seqüências, usualmente inferiores a 10 pares de bases de nucleotídeos, situadas em segmentos não codificantes de proteínas. A extensão destas seqüências deve ser exatamente a mesma em todas as células de uma mesma pessoa. Através de eletroforese, compara-se amostras de células de tecido normal (esfregaço de mucosa oral, por exemplo) com células tumorais. Encontrando-se diferenças entre os pesos moleculares dos microssatélites das 2 amostras, teremos uma demonstração de que ocorreram mutações nas seqüências de microssatélites no tecido tumoral, com perda de nucleotídeos. A estas mutações dá-se o nome de instabilidade de microssatélites, achado característico de um funcionamento deficiente das proteínas de reparo (*mismatch repair*). Nestes casos, o tumor em questão é descrito como sendo RER (+), ou seja, positivo para erros de replicação (*replication error*) (10,37).

Existe hoje grande importância clínica quando demonstra-se RER (+) em um tecido tumoral: tumores malignos colorretais RER (+) – tendência a localizar-se em cólon direito, maior incidência em mais jovens; embora mais freqüente em carcinomas pouco diferenciados e produtores de muco, vários relatos referem melhores índices de sobrevivência (37,38); predisposições autossômicas dominantes ao câncer colorretal podem estar associadas a defeitos em genes formadores de proteínas de reparo, especialmente os hMSH2 e hMLH1. A herança destes defeitos determina o desenvolvimento do câncer colorretal hereditário não polipóide (mais conhecido pela sigla em inglês, HNPCC). RER (+) está presente em mais de 90% dos tumores colorretais em portadores de HNPCC, e apenas em cerca de 15% dos

cânceres colorretais esporádicos. Com o achado de um câncer colorretal RER (+), é mandatório investigar se este paciente pertence a uma família de portadores de HNPCC (9,10,39).

Carcinogênese colorretal

Qualquer teoria elaborada sobre carcinogênese colorretal não deve ignorar que seu desenvolvimento inclui múltiplas variáveis, como elementos externos (agentes ambientais e dietéticos), bem como fatores internos de natureza somática ou hereditária.

Fatores externos (ambientais e dietéticos) – existem evidências irrefutáveis de que elementos dietéticos e possivelmente ambientais desempenham um papel significativo no desenvolvimento do câncer colorretal (10). Algumas destas evidências são:

- maior incidência em países da Europa e América do Norte;
- predominância em populações urbanas;
- correlação positiva com o grau de desenvolvimento cultural das regiões.

Estas diferenças populacionais parecem obedecer muito mais a fatores dietéticos e ambientais do que a uma eventual predisposição genética, uma vez que indivíduos migrantes de áreas de menor risco para regiões de maior incidência de câncer colorretal tendem a adquirir uma maior probabilidade de desenvolver a doença, passando a apresentar os riscos desta nova região.

Dentre os fatores dietéticos especificamente, destacam-se o baixo consumo de fibras vegetais, a ingestão de gordura animal e a redução na ingestão de cálcio como fatores de risco.

Fatores internos (natureza somática ou hereditária) – nas últimas décadas, vários pesquisadores vêm estudando estes fatores em bases histológicas e, mais recentemente, em bases da biologia molecular.

Modelos de carcinogênese colorretal

A polipose adenomatosa familiar auxiliou de forma decisiva a compreensão da etiologia do câncer colorretal por representar um verdadeiro modelo *in vivo* de carcinogênese. Nela, coexistem os múltiplos estágios da

carcinogênese, podendo ser encontrados num mesmo paciente desde uma mucosa normal até a presença de um câncer e ainda pólipos adenomatosos em diversos estágios intermediários de tamanho e displasia.

Há várias décadas encontra-se estabelecido o conceito de que todo pólipo adenomatoso apresenta um potencial para malignização e que este potencial é proporcional ao tamanho do pólipo, podendo atingir índices acima de 30% em lesões polipóides vilosas e sésseis com base extensa (10).

Vários estudos demonstraram que existe correlação entre o tamanho do adenoma e tipo de proteína mutada, estabelecendo desta forma uma correlação entre o estágio do adenoma e a alteração genética. Vogelstein et al. (40) relataram que a proteína k-ras apresentava mutação em 58% dos adenomas maiores que 10 mm, e em apenas 9% daqueles menores que 10 mm. De Benedetti et al. (15) demonstraram que 77% dos adenomas vilosos ou tubulovilosos apresentavam mutação do gene APC, enquanto que apenas 33% dos adenomas tubulares, de menor potencial maligno, apresentavam a mesma mutação.

Seqüência adenoma-carcinoma

Fearon & Vogelstein, em 1990 (41), propuseram um modelo genético capaz de explicar a evolução de uma lesão colônica pré-maligna em maligna – a seqüência adenoma-carcinoma. Eles demonstraram que o surgimento de tumores colorretais é o resultado de um acúmulo seqüencial de 4 ou 5 mutações distintas, correspondendo cada uma destas a um estágio histológico diferente nesta seqüência adenoma-carcinoma (figuras 3 e 4).

Primeiro estágio: mutação do gene APC - parece ser a primeira alteração na seqüência adenoma-carcinoma. Uma mutação que inative a proteína APC resultará na perda de sua função reguladora sobre a proliferação epitelial, levando a uma maior produção celular, ao surgimento de um estado hiperproliferativo e conseqüentemente à formação de um pequeno adenoma.

Uma das primeiras conseqüências da mutação do gene APC seria a hipometilação do DNA. Um dos fatores reguladores intrínsecos desta replicação do DNA é a

colocação de um radical metila na cadeia de DNA, anteriormente a um determinado gene, de forma a impedir a leitura deste. Assim sendo, a falta deste radical metila, ou hipometilação, irá servir como um estímulo à proliferação celular.

Segundo estágio: ativação da proteína k-ras – uma vez existindo o desequilíbrio da proliferação celular de um adenoma inicial, uma mutação adicional no gene K-ras irá produzir uma proteína alterada, que funcionará como um oncogene, estimulando ainda mais a proliferação e contribuindo para uma evolução do adenoma inicial para um adenoma intermediário.

Terceiro estágio: mutação da proteína DCC – é adicionada a perda da capacidade de aglutinação celular. Esta mutação foi encontrada em 70-80% dos carcinomas colorretais e 50% dos adenomas tardios, caracterizando-se como uma alteração tardia no processo da carcinogênese (9,10,41).

Quarto estágio: mutação da proteína p53 – considerada como a alteração decisiva no processo de malignização de uma lesão adenomatosa benigna, sendo encontrada em cerca de 75% dos carcinomas colorretais e relativamente infreqüente nos adenomas em qualquer estágio. A perda da função da proteína p53 em tecido já em estado de hiperproliferação causará um acúmulo de mutações cromossômicas, característica básica nos carcinomas invasivos e metastáticos.

Existem indícios de que o acúmulo destas mutações é mais importante do que sua ordem de ocorrência, embora esta seqüência de mutações pareça ocorrer preferencialmente na maioria dos casos. Fearon & Vogelstein (41) relataram ainda que 7% dos adenomas iniciais apresentam mais de uma das 4 mutações, enquanto que 25% dos adenomas intermediários, 49% dos adenomas tardios e 90% dos carcinomas apresentam pelo menos 2 das 4 mutações.

Reparos de defeituosos (*mismatch repair*)

Representa um outro caminho capaz de promover a carcinogênese (39) (figura 3). A principal característica genética é, como descrita previamente, a perda da função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA,

Carcinogênese através da ocorrência de erros de replicação (RER+)

Carcinoma

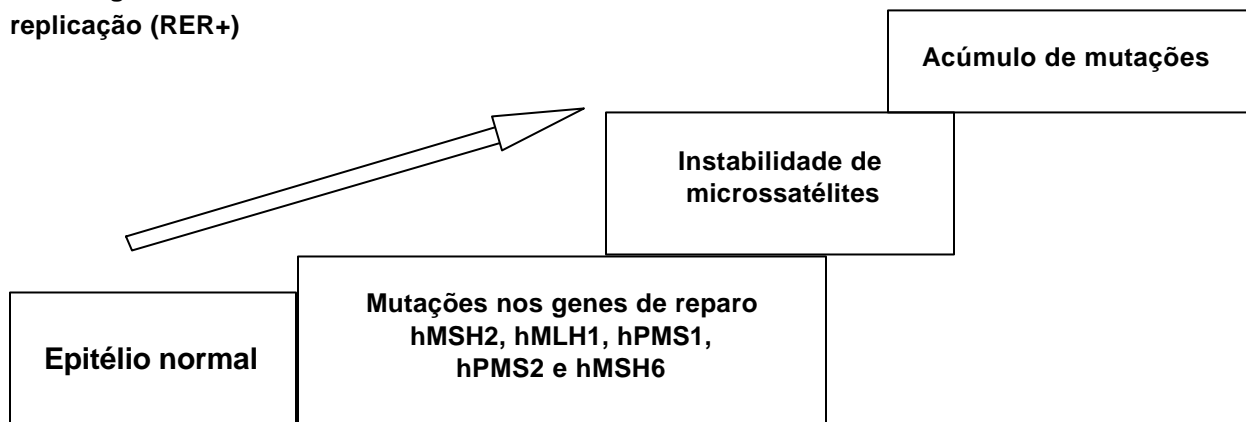


Figura 3. Reparos defeituosos (*mismatch repair*)

conhecidos como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6. Mutações dos genes APC, K-ras, DCC ou p53 são raramente encontradas em portadores de câncer colorretal hereditário não-polipóide (HNPCC). Como resultado, observaremos um acúmulo de mutações genéticas no DNA, o qual irá desencadear um processo de carcinogênese distinto do descrito previamente, não estando esclarecida a participação ou não da seqüência adenoma-carcinoma. Acredita-se que 15% dos carcinomas colorretais esporádicos sejam formados a partir deste caminho.

Carcinogênese a partir de adenoma plano

É um terceiro caminho para o surgimento do câncer colorretal, postulado principalmente por autores japoneses (42,43). Baseia-se na formação de carcinomas a partir de mucosa macroscopicamente normal (também conhecido como carcinoma "de novo"), identificados endoscopicamente como áreas com discreta elevação acompanhada de coloração avermelhada e ocasionalmente contendo uma depressão central. O estudo histológico é compatível com adenoma tubular com tendência à expansão lateral através da muscular da mucosa e uma elevada freqüência de atipias severas. Estas áreas, denominadas como adenomas planos, foram relacionadas ao surgimento de carcinomas "de novo". Foi relatada a existência de uma transmissão familiar chamada de síndrome do adenoma plano hereditário (da sigla em inglês HFAS). Existem controvérsias a respeito de sua

importância na carcinogênese colorretal, bem como de sua real incidência. Isto se deve ao fato de que uma vez deformada a parede colônica quando do diagnóstico não se pode precisamente determinar se a lesão precursora foi realmente uma lesão polipóide ou plana. Considera-se que o índice de malignização dos adenomas planos pode atingir até 13%. Não existem ainda evidências capazes de explicar em bases moleculares este possível processo de carcinogênese "de novo" (10).

Câncer esofágico

Existe uma forte associação entre câncer esofágico e fatores ambientais. Sua alta incidência em certas áreas geográficas e sua forte relação com tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e outras toxinas é bem conhecida (9). Mutações de p53 e a perda da heterozigose do gene APC são achados freqüentes no carcinoma de esôfago (2,44) (tabela 2). A incidência de mutação de ras é praticamente nula. Não se sabe se há a mutação de ras ou a ativação do receptor de tirosina quinase (com conseqüente ativação dos complexos ciclina/CDK). Sabe-se que a ativação dos receptores de tirosina quinase determina um aumento da expressão de ciclina D, que acaba por resultar na liberação de fator de transcrição, com progressão para a fase G1 do ciclo celular. Demonstrou-se que o gene para ciclina D1 encontra-se amplificado em cerca de 20% dos casos de câncer do esôfago (7). p16 inibe a CDK, que regula especificamente a atividade da proteína

Tabela 2. Proteínas envolvidas na carcinogênese esofágica

Proteína	Função	Observações
APC	Supressão	Mais relacionada ao esôfago Barrett/adeno CA
p53	Supressão	Achado freqüente
p21	Supressão	Ativada pelo p53, inibe complexos ciclina-CDK
Proteínas de reparo	Supressão	Mais freqüente no esôfago Barrett/ adeno CA
p16	Supressão	50% nos CCE
pRb	Supressão	Bloqueio célula na fase G0/G1
Ciclina D1	Reparo	Amplificado em 20% dos casos

quinase associada à ciclina D. Encontra-se mutação do gene p16 em aproximadamente 50% dos casos de carcinomas de células escamosas de esôfago (CCE). Portanto, provavelmente a ativação funcional de ciclina D proteína quinase é um evento necessário para o desenvolvimento de câncer esofágico e pode ser mediado tanto pela superexpressão de ciclina D quanto pela falta de p16 (9,45).

Outro evento que parece estar associado ao desenvolvimento do câncer esofágico é o aumento de receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFr) e HER2/neu, pois estes são encontrados superexpressos em proporções significativas (6,46).

A esofagite crônica está associada a uma lesão pré-maligna, o esôfago de Barrett. Reid et al. (47) estudaram exaustivamente as bases moleculares da progressão maligna no esôfago de Barrett. Eles demonstraram que a instabilidade em regiões microssatélites e mutações dos genes p53 e APC são comuns e devem ser eventos iniciais no processo da carcinogênese esofágica (48). Alterações em regiões microssatélites são mais comumente encontradas nos adenocarcinomas (associados ao esôfago de Barrett) do que nos CCE. Foi observado que mutações do gene p53 ocorrem precocemente nestas lesões, e algumas vezes antes mesmo da perda da heterozigose do gene APC.

Apesar do grande esforço para se determinar a relevância clínica desses achados, sua correlação com o prognóstico ainda não pode ser determinada de forma definitiva (45).

Os mecanismos já conhecidos que participam da carcinogênese esofágica e suas conseqüências sobre o ciclo celular encontram-se resumidos na figura 4. Uma vez ativada, a p53 promove seu efeito inibitório sobre várias proteínas. Uma das vias que recebe este efeito é a constituída pelas proteínas p16, ciclina D1, quinase dependente de ciclina-4 (CDK-4) e a pRb. O gene p16 é um inibidor do complexo ciclina CDK-4, e encontra-se mutado em cerca de 50% dos casos (p16 = gene supressor tumoral). A pRb é uma fosfoproteína que regula o ciclo celular: quando ativa, paralisa a célula na fase de G0/G1, bloqueando o avanço através da fase S, através da não ativação dos fatores de transcrição gênica (FT), impedindo assim que estes exerçam sua função transcricional. O complexo ciclina-CDK-4 pode inativar a pRb, liberando os FT para a síntese protéica, permitindo a passagem da fase G1 para S. Quando p53 é ativada, ocorre a transcrição do gene p21, que codifica um proteína inibitória dos complexos de ciclina-CDK. Com isso, p53, via p21, bloqueia a transcrição de genes fundamentais para a transcrição da fase G1 para S - checkpoint (figura 4) (17,45).

Câncer gástrico

O câncer de estômago é a segunda doença maligna mais comum no mundo. Embora alterações dos genes p53 e APC e instabilidade em regiões microssatélites ocorram em frequência significativa nos carcinomas do estômago, existe pouca associação entre esses achados e a progressão da doença (49-51). Sabe-se que a superexpressão de HER/neu é encontrada em 40% dos carcinomas gástricos e deve constituir-se em objeto de estudo com finalidade terapêutica no futuro (52). Estudos continuam a ser desenvolvidos na tentativa de identificar as alterações biomoleculares envolvidas na carcinogênese dos tumores gástricos. Entretanto, não foi possível até o momento demonstrar os diversos passos envolvidos, e as descobertas foram destituídas de correlação clínica (45).

Implicações clínicas

Em um curto prazo, existem 3 aplicações clínicas para a relação entre os eventos moleculares requeridos para a carcinogênese e a sua resposta para o desenvolvimento tumoral no hospedeiro:

1. Diagnóstico precoce: já existe suporte tecnológico para a detecção de ras, p53 e outras mutações nas fezes, suco gástrico e secreções pancreáticas (9,20,26). Embora factível, existem questões a serem definidas, como a real sensibilidade dos exames em relação aos seus padrões-ouro e os problemas de custo-efetividade. Não se sabe se a triagem de mutações nas fezes é superior à triagem endoscópica. Por exemplo, em indivíduos de alto risco com HNPPC ou esôfago de Barrett, a triagem biomolecular parece ser

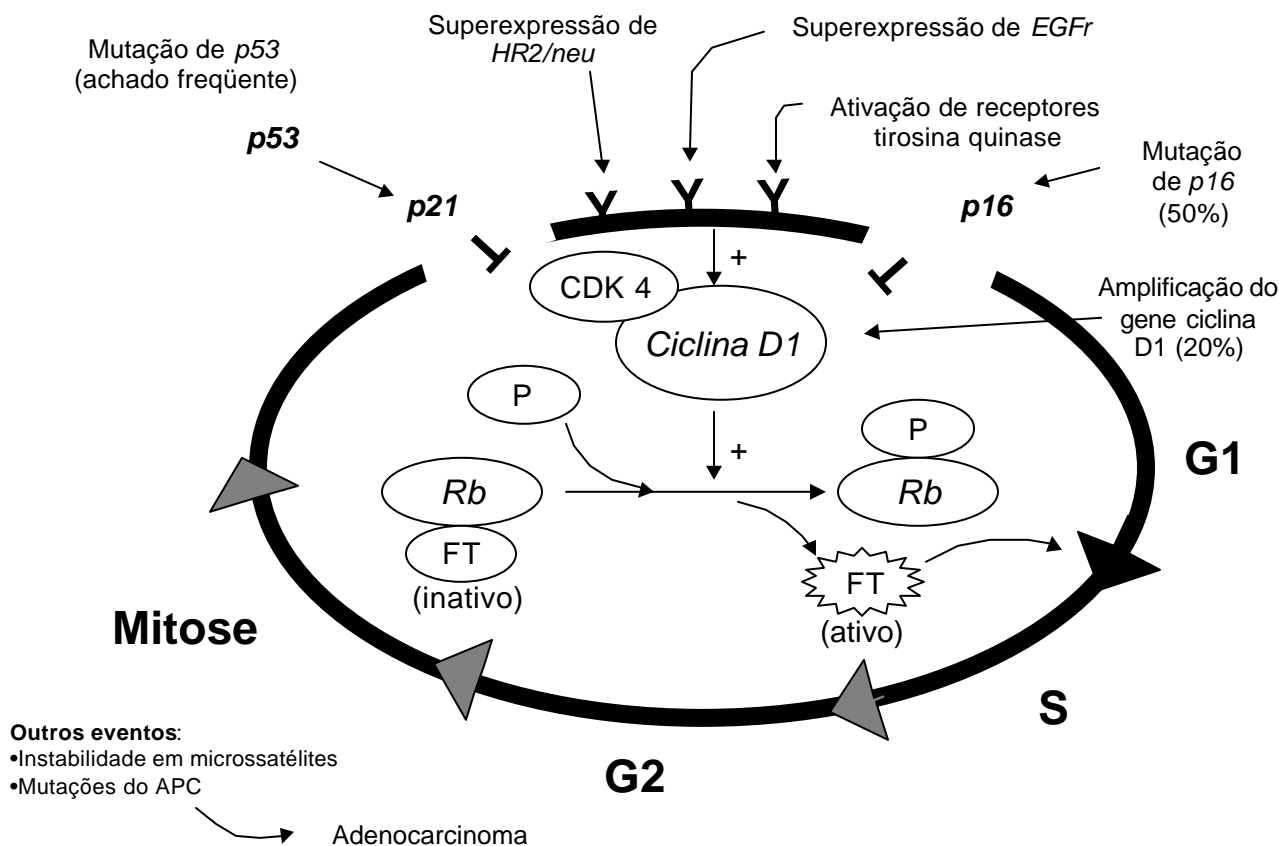


Figura 4. Mecanismos e alterações genéticas envolvidos na carcinogênese esofágica.

economicamente factível, porém, não se tem definição em relação ao seu padrão-ouro, a endoscopia.

2. Marcadores prognósticos: mutações em p53, DCC e perda da heterozigose têm sido relatados como marcadores de pior prognóstico (9). Não está claro quais suas vantagens em relação aos critérios patológicos tradicionais. Realisticamente, o prognóstico dos cânceres pancreáticos e esofágicos é tão pobre que é difícil imaginar que marcadores definiriam um subgrupo com uma significativa melhora nos resultados. Marcadores são provavelmente mais úteis para definir quais indivíduos nos estádios II e III de cânceres gástricos e colorretais terão mais probabilidade de recidivar ou responder à determinada terapia adjuvante. Desta forma, a correlação de características clínicas com as alterações genéticas podem ser promissoras (9).

3. Novos tratamentos: vários trabalhos baseiam-se na idéia de que a viabilidade de um carcinoma depende da ativação ou inativação de certos produtos genéticos. Assim, a inibição de proto-oncogenes ou a reintrodução de proto-oncogenes inativados foi tentado com sucesso, e, no momento, parece pelo menos possível de realização. A reintrodução do p53 natural (*wild-type*), DCC ou APC não mutados, ou bloqueio do k-ras mutado levaram à parada do crescimento ou à reversão do câncer colorretal (9).

Várias estratégias foram desenvolvidas:

- reintrodução dos genes supressores naturais (*wild-type*) dentro dos tumores, utilizando vetores virais: estudo encontra-se em fase pré-clínica, focado no p53 em câncer de pulmão;
- introdução de peptídeos que, ligados à forma mutada de p53, induziriam a conformação ativa (não-mutada) deste;
- teste de drogas, em modelos murinos, que inibiriam o potencial maligno de células que contenham mutações em genes supressores tumorais na linhagem celular germinativa: vários estudos em andamento;
- desenvolvimento de novas drogas que inibam a atividade dos produtos de proto-oncogenes mutados ou superexpressados: abordagem farmacológica tradicional;
- inibição farmacológica do p21ras:

estratégia recente, mostrou induzir regressão tumoral com pouca toxicidade em animais.

Referências

1. Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Lund E, Gaudernack G, Meling GI, et al. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(1):62-9.
2. Bennett WP, Hollstein MC, He A, Zhu SM, Resau JH, Trump BF, et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. *Oncogene* 1991;6(10):1779-84.
3. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
4. Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13(4):1009-22.
5. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* 1992;70(6 Suppl):1727-31
6. Hollstein MC, Smits AM, Galiana C, Yamasaki H, Bos JL, Mandard A, et al. Amplification of epidermal growth factor receptor gene but no evidence of ras mutations in primary human esophageal cancers. *Cancer Res* 1988;48(18):5119-23.
7. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992;52(10):2980-3.
8. Tahara E. Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection. *Exp Toxicol Pathol* 1998;50(4-6):375-8.
9. Rosen N. DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 971-80.
10. Pinho M, Rossi BM. Rossi BM, Pinho M, editors. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. 1ª ed. São Paulo: Lemar; 1999. p. 143-72.
11. Boland CR. The biology of colorectal cancer. Implications for pretreatment and follow-up management. *Cancer* 1993;71(12 Suppl):4180-6.
12. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* 1996;83(4):437-46.

13. Menger MD, Vollmar B. Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research. *Br J Surg* 1996;83(5):588-601.
14. Bufill JA. Colorectal cancer genetics. Closing the gap between genotype and phenotype. *Cancer* 1995;76(12):2389-92.
15. De Benedetti L, Sciallero S, Gismondi V, James R, Bafico A, Biticchi R, Masetti E, Bonelli L, Heouaine A, Picasso M. Association of APC gene mutations and histological characteristics of colorectal adenomas. *Cancer Res* 1994;54(13):3553-6.
16. Wu JS, Paul P, McGannon EA, Church JM. APC genotype, polyp number, and surgical options in familial adenomatous polyposis. *Ann Surg* 1998;227(1):57-62.
17. Lopes A, Nakagawa W, Mello CAL, Rossi BM, Pinho M, editors. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. 1ª ed. São Paulo: Lemar; 1999. p. 125-42.
18. Minamoto T, Yamashita N, Ochiai A, Mai M, Sugimura T, et al. Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer* 1995;75(6 Suppl):1520-6.
19. Ohnishi T, Tomita N, Monden T, Ohue M, Yana I, Takami K, Yamamoto H, Yagyu T, Kikkawa N, Shimano T, et al. A detailed analysis of the role of K-ras gene mutation in the progression of colorectal adenoma. *Br J Cancer* 1997;75(3):341-7.
20. Ratto C, Flamini G, Sofo L, Nucera P, Ippoliti M, Curigliano G, Ferretti G, Sgambato A, Merico M, Doglietto GB, et al. Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis Colon Rectum* 1996;39(11):1238-44.
21. Senagore AJ, Biener JT. A newly identified pattern of K-ras mutations at codons 12 and 13 is associated with long-term survival in colorectal cancer. *Surgery* 1997;122(4):765-70.
22. Ward RL, Todd AV, Santiago F, OConnor T, Hawkins NJ. Activation of the K-ras oncogene in colorectal neoplasms is associated with decreased apoptosis. *Cancer* 1997;79(6):1106-13.
23. Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J, Walsh MD, Bates P, Simmons DL, Antalis TM. The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 1996;13(4):787-95.
24. Goi T, Yamaguchi A, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Reduced expression of deleted colorectal carcinoma (DCC) protein in established colon cancers. *Br J Cancer* 1998;77(3):466-71.
25. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele GJ, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996;335(23):1727-32.
26. Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 1996;77(8 Suppl):1707-10.
27. Hanski C, Bornhoeft G, Shimoda T, Hanski ML, Lane DP, Stein H, et al. Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinomas of different histologic types. *Cancer* 1992;70(12):2772-7.
28. Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, ODonoghue DP, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. *J Pathol* 1996;180(4):364-70.
29. Sameshima S, Kubota Y, Sawada T, Watanabe T, Kuroda T, Tsuno N, et al. Overexpression of p53 protein and histologic grades of dysplasia in colorectal adenomas. *Dis Colon Rectum* 1996;39(5):562-7.
30. Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996;74(2):216-23.
31. Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, StÅl O, Wingren S, Hatschek T, Nordenskjöld B. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992;340(8832):1369-73.
32. Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, Arbman G, Nordenskjöld B. Prognostic significance of p53 nuclear and cytoplasmic overexpression in right and left colorectal adenocarcinomas. *Eur J Cancer* 1996;32A(11):1963-7.
33. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992;70(12):2778-84.
34. Yamaguchi K, Sugano K, Fukayama N, Nakashima Y, Saotome K, Yokoyama T, et al.

- Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. *Am J Gastroenterol* 1997;92(2):307-12.
35. Galniche A, Fléjou J. Le contrôle du cycle cellulaire. Implications en oncologie digestive. *Hepato-gastro* 1996;3(4):295-9.
 36. Cunningham C, Dunlop MG. Molecular genetic basis of colorectal cancer susceptibility. *Br J Surg* 1996;83:321-9.
 37. Jass JR, Cottier DS, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML, et al. Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995;346(8984):1200-1.
 38. Lukish JR, Muro K, DeNobile J, Katz R, Williams J, Cruess DF, et al. Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 1998;227(1):51-6.
 39. Lynch HT, Watson P, Smyrk TC, Lanspa SJ, Boman BM, Boland CR, et al. Colon cancer genetics. *Cancer* 1992;70(5 Suppl):1300-12.
 40. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
 41. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
 42. Muto T, Nagawa H, Watanabe T, Masaki T, Sawada T. Colorectal carcinogenesis: historical review. *Dis Colon Rectum* 1997;40(10 Suppl):80-5.
 43. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y, et al. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum* 1985;28(11):847-51.
 44. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368(6473):753-6.
 45. Ferreira FO, Haddad FJ, Rossi BM, Pinho M, editors. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. 1ª ed. São Paulo: Lemar; 1999. p. 213-49.
 46. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54(13):3396-7.
 47. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993;105(1):119-29.
 48. Meltzer SJ, Yin J, Manin B, Rhyu MG, Cottrell J, Hudson E, et al. Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's-associated esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1994;54(13):3379-82.
 49. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis [editorial]. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119(5):265-72.
 50. Correa P, Shiao YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1994;54(7 Suppl):1941s-3s.
 51. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994;9(1):29-32.
 52. Lin JT, Wu MS, Shun CT, Lee WJ, Sheu JC, Wang TH. Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoma is associated with enhanced expression of erbB-2 oncoprotein. *Cancer Res* 1995;55(7):1428-30.
 53. Rossi BN. *Genética e biologia molecular para o cirurgião geral*. São Paulo: LEMAR; 1999.