

BIOLOGIA MOLECULAR NO CÂNCER COLORRETAL: EXERCÍCIO TEÓRICO OU MÉTODO PARA APLICAÇÃO CLÍNICA DIÁRIA?

MAURO DE SOUZA LEITE PINHO - TSBCP

PINHO MSL - Biologia molecular no câncer colorretal: exercício teórico ou método para aplicação clínica diária? *Rev bras Coloproct*, 2000; 20(1): 58-61

O rápido desenvolvimento dos conhecimentos em biologia molecular, em particular na área oncológica, tem trazido sentimentos bastante conflitantes para aqueles que atuam na área clínica. Se por um lado percebemos, ainda que de forma pouca, a importância histórica do momento em que vivemos através do esclarecimento das origens dos diferentes tumores, por outro lado não conseguimos compreender exatamente como estes novos conhecimentos poderão auxiliar no seu objetivo final de proporcionar um melhor tratamento para nossos pacientes. Além disto, é impressão corrente que os métodos empregados para a análise da biologia molecular dos tumores são extremamente complexos e necessitam de equipamentos de alto custo, estando portanto inacessíveis para a grande maioria dos laboratórios existentes em nossos hospitais.

O objetivo desta seção é tentar esclarecer estes aspectos, colocando-os em especial na perspectiva atual de nosso dia-a-dia e proceder uma breve análise dos caminhos que irão em um futuro próximo alterar radicalmente a forma pela qual compreendemos hoje as doenças, em especial na área da oncologia. Para atingir estes objetivos tentaremos responder a algumas questões básicas de forma sequencial, como se segue:

1. Afinal, o que chamamos de “biologia molecular”?

Históricamente, a medicina sempre evoluiu através da identificação de cada doença a partir dos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes. Identificada a doença, são então pesquisadas e catalogadas as alterações do organismo causadas por esta doença, sejam estas de natureza macroscópica, microscópica ou metabólica. Na seqüência, busca-se determinar o fator causal da doença afim de

identificarmos se esta deve-se ao contato com agentes externos capazes de provocar modificações no funcionamento normal do organismo. Neste grupo de doenças causadas por agentes externos estão, por exemplo, todos os processos de natureza infecciosa e a exposição a agentes químicos e físicos lesivos como o álcool, fumo, poeira tóxica, medicamentos com efeitos colaterais, radiações, etc.

Em outro grupo de doenças os fatores desencadeantes estarão relacionados a lesões decorrentes de traumas acidentais ou provocados através de atividades de natureza esportiva, profissional ou postural.

Descontadas aquelas incluídas nos grupos acima, nas quais um provável agente causal foi identificado, restará ainda um grande número de doenças cuja origem é ainda desconhecida. Muitas destas doenças foram inteiramente elucidadas quanto à seqüência de eventos que determinam sua fisiopatologia, porém permanece obscuro o elemento decisivo que desencadeou o processo mórbido. Neste grupo podemos incluir como exemplos a grande maioria das neoplasias, as doenças decorrentes da aterosclerose (sejam elas cardiovasculares, neurológicas ou renais), assim como as doenças de natureza imunológica ou funcionais.

Algumas doenças, como as cardiovasculares e neoplásicas, podem ainda ser claramente reconhecidas como sendo uma característica mais freqüente entre indivíduos de uma mesma família, levando à óbvia conclusão de que não apenas existe um fator causal específico, mas também que este fator pode ser transmitido de forma hereditária.

Neste contexto, a grande revolução introduzida pela biologia molecular deve-se à constatação de que, sendo um organismo formado por alguns trilhões de unidades vivas denominadas células, as doenças são, independentemente de sua origem, provocadas pelas próprias células através de um funcionamento inadequado de processos biológicos normais.

Por processos biológicos normais compreendemos um universo de reações químicas que ocorrem de forma

coordenada por um sistema que poderíamos didaticamente comparar a um altamente complexo programa de computador o qual é compactado em um único “chip” e implantado na primeira célula de um indivíduo, denominada célula-ovo ou zigoto. Este “chip”, contendo o programa de formação e funcionamento de um indivíduo é na verdade uma grande molécula denominada DNA a qual diferencia-se de seus hipotéticos “primos eletrônicos” pela fantástica capacidade de reproduzir-se de forma coordenada e de ser processada através de reações químicas, desde que sejam regularmente fornecidos os insumos básicos para tal, insumos estes conhecidos como nutrientes e presentes apenas nos seres vivos integrantes de uma cadeia iniciada há milhões de anos em uma única célula primitiva no fundo do mar.

Respondendo à pergunta formulada acima, podemos então sumarizar dizendo que por biologia molecular compreendemos a ciência que busca decodificar este “programa” compactado no DNA e presente de forma idêntica no interior de cada célula humana, compreender seu funcionamento e detectar as alterações que são os elementos causais da maior parte das doenças que acometem o ser humano.

2. Como a molécula de DNA é capaz de manter funcionando um sistema capaz de multiplicar o número de células e realizar as atividades metabólicas do organismo?

Como temos visto nas seções anteriores, o DNA é uma seqüência de pares de bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina e citosina). Segmentos específicos desta seqüência funcionam como um código a partir do qual serão sintetizadas proteínas. Estes segmentos são denominados genes e as proteínas resultantes serão os agentes responsáveis por fazer o organismo funcionar, atuando como hormônios, elementos de defesa, mantenedoras da pressão oncótica, enzimas e, particularmente, controlando a comunicação entre as células e conseqüentemente suas ações de proliferação, secreção e metabolismo em geral.

Assim sendo, um gene é responsável pela produção de uma proteína. Ocorrendo qualquer alteração neste gene, sua expressão (produção protéica) ficará prejudicada e a proteína resultante poderá ser inoperante, levando a conseqüências importantes em sua área de atuação. A doença é então o resultado deste processo envolvendo um gene alterado e seu produto protéico comprometido.

3. Como podemos analisar a integridade de um determinado gene?

Através de duas formas. Na primeira delas, mais direta, utilizamos processos que irão estudar o próprio gene. Na

outra abordagem, indireta, iremos pesquisar a integridade de seu produto, ou seja, a proteína. Embora existam diversas técnicas para o estudo de genes e proteínas, apresentaremos sumariamente abaixo os dois procedimentos mais realizados e que apresentam um maior potencial de utilização clínica:

a. Sequenciamento direto do gene

No primeiro caso, a análise direta de um gene específico significa conhecer toda a seqüência de bases que o compõem, expressa como GCAATTCTCAGTCCGT etc.

Para realizar esta tarefa destacaríamos duas etapas essenciais:

Primeira etapa: Amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A primeira fase do estudo de um gene consiste na retirada do DNA do tecido a ser estudado. Uma vez isolado, é necessária a determinação do segmento de DNA a ser estudado, o qual necessita ser amplificado afim de obtenção de um volume de material capaz de ser analisado. Para este fim utiliza-se um processo denominado PCR (do inglês polymerase chain reaction) através do qual o DNA isolado é submetido a sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento visando promover repetidas dissoluções e restabelecimento das ligações químicas que mantêm unidas as duas fitas da molécula. Como são adicionados também outros elementos como as sondas que irão determinar o segmento a ser amplificado (primers), a enzima DNA polimerase e um grande volume de bases nitrogenadas isoladas, temos como resultado uma rápida multiplicação exponencial do segmento escolhido de DNA levando à obtenção de um volume de material suficiente para a realização de análises.

Segunda etapa: Determinação da seqüência de bases nitrogenadas.

Uma vez obtida uma amplificação do segmento gênico a ser estudado, necessitamos agora fazer o sequenciamento, ou seja, a determinação da seqüência de bases nitrogenadas (A, T, G, C) que o compõem. Embora esta possa ser realizada através de métodos “manuais”, estes são demorados e trabalhosos, tornando pouco viável sua realização em escala comercial para aplicação prática. Após o desenvolvimento de aparelhos que permitem um rápido sequenciamento eletrônico, este procedimento tende a tornar-se cada vez mais viável, embora ainda esteja em nosso meio restrito a poucos centros de referência.

b. Análise do produto da expressão gênica: a proteína

Este é um método indireto através do qual podemos aferir a integridade de um gene através da análise de seu produto, ou seja, a proteína. Embora este método seja menos sensível do que o sequenciamento do gene, sua utilização clínica é bastante mais viável, uma vez que pode ser realizado através da técnica de imunohistoquímica, a qual já é rotineiramente realizada por um grande número de laboratórios de anatomia patológica. A imunohistoquímica consiste na adição de anticorpos específicos para uma determinada proteína a uma lâmina contendo o tecido a ser examinado. Ao encontrar a proteína em questão haverá a formação do complexo antígeno-anticorpo em seu local de depósito, seja no núcleo ou citoplasma. Como este anticorpo é previamente tratado através de coloração especial, a existência ou não da proteína a ser pesquisada poderá ser constatada à simples observação da lâmina ao microscópio óptico. A confirmação da existência da proteína normal poderá atestar a integridade do gene em questão. Este é um método de custo relativamente baixo sendo no momento o mais acessível para a realização de estudos de biologia molecular em bases clínicas fora de ambientes de pesquisa.

4. Quando devemos realizar estudos de biologia molecular em nossa prática clínica?

São duas as razões pelas quais devemos realizar estudos sobre a biologia molecular no câncer colorretal:

a. Pesquisa de câncer colorretal hereditário

Como sabemos, existem duas doenças reconhecidas pré-malignas transmitidas por hereditariedade: a polipose adenomatosa familiar e o câncer colorretal não-polipóide hereditário (HNPCC). O diagnóstico da primeira é bastante simples através da visualização de inúmeros pólipos que se manifestam geralmente após a adolescência. No caso do HNPCC no entanto o diagnóstico é mais difícil devido à ausência de pólipos, necessitando uma boa história familiar, um alto grau de suspeição e, se possível, a identificação da mutação genética nos genes envolvidos.

A origem genética destas doenças é amplamente reconhecida como sendo resultado da mutação de genes específicos, como o gene APC no caso da polipose familiar e os genes de reparo hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2 e hMSH6 para HNPCC.

Assim sendo, a detecção de uma mutação nestes genes,

particularmente no HNPCC, representaria o elemento decisivo para o fechamento de um diagnóstico necessário para o estabelecimento de uma conduta de seguimento ou eventual tratamento profilático de uma doença de elevado potencial pré-maligno. Para demonstrar a existência destas mutações, é necessário realizar-se o sequenciamento destes genes o que, como dissemos acima, pode ser feito de forma “manual” ou através de sequenciamento eletrônico. Entretanto, este é ainda um procedimento relativamente complexo o qual compreende os seguintes aspectos:

*** Conhecimento da mutação do probando**

Por “probando” compreendemos o primeiro indivíduo de uma família cuja doença manifestou-se demonstrando a existência de um processo mórbido de natureza genética e hereditária. A pesquisa dos genes suspeitos deste indivíduo é fundamental para a identificação do padrão de mutação desta família em especial. Para tal, seu exame de sequenciamento necessita ser o mais completo, abrangendo toda a extensão dos genes em questão. Uma vez identificado o segmento dentro do gene e o tipo de mutação, o exame dos outros membros da família será bastante facilitado pois bastará a pesquisa deste segmento específico, tornando o exame mais rápido e de menor custo.

*** Importância do tipo de mutação**

Os efeitos de uma mutação genética são diretamente relacionados ao tipo de mutação existentes e sua localização dentro do gene, podendo gerar conseqüências de intensidade bastante variável. Para isto reconhecem-se hoje diversos tipos de mutações em cada gene envolvido no câncer colorretal, tornando mais fácil a identificação dos locais mais freqüentemente afetados e suas conseqüências fenotípicas sobre o organismo do indivíduo.

*** Imprevisibilidade do método**

Além do custo elevado e necessidade de sequenciadores eletrônicos para viabilizar a realização deste procedimento em escala clínica, outro grande obstáculo para o diagnóstico genético do HNPCC é a imprevisibilidade dos resultados. Embora seis genes de reparo já tenham sido identificados como potenciais sítios de mutações, em um grande número de pacientes que preenchem os chamados critérios de Amsterdam ou de Bethesda não é possível detectar qualquer mutação, deixando margem à suspeita de que existam outros genes envolvidos na etiologia desta doença.

*** Aplicabilidade clínica atual**

Considerando os aspectos mencionados acima, a confirmação genética por sequenciamento é ainda um procedimento de aplicabilidade clínica bastante limitada nos casos de polipose adenomatosa familiar e HNPCC devido ao fato de que raros centros em nosso meio dispõem de condições para realizar estes exames em escala comercial (como o Instituto Ludwig, em São Paulo). Existem no entanto fortes evidências de que em muito breve tais exames serão realizados de rotina com uma menor complexidade, duração e custos graças ao desenvolvimento de métodos e equipamentos mais adequados à utilização em escala clínica, como veremos adiante.

b. Pesquisa do padrão tumoral e seu prognóstico

Este é possivelmente o elemento mais significativo dentro da biologia molecular no câncer colorretal, representando uma revolução nos conceitos atuais com importantes conseqüências no diagnóstico e tratamento desta doença.

Tradicionalmente o câncer colorretal é considerado como uma única doença embora com padrões de comportamento biológico reconhecidamente distintos. Estudos mais recentes em biologia molecular tem demonstrado que o surgimento de um processo neoplásico colorretal é na verdade o resultado comum de diversas mutações genéticas distintas as quais irão levar à perda da capacidade de autocontrole de uma célula intestinal em seu ciclo de reprodução. Dependendo do tipo de mutação predominante no tumor em questão seu comportamento biológico será distinto e determinante do prognóstico do paciente.

Para fins didáticos poderíamos traçar uma analogia com a existência de um processo inflamatório na mucosa intestinal o qual, embora possa apresentar-se de forma semelhante nos aspectos clínicos e endoscópicos, terá um padrão de evolução e prognóstico bastante distintos dependendo da sua etiologia, seja esta infecciosa, isquêmica, actínica ou idiopática, não podendo conseqüentemente ser considerada como uma única doença.

Alguns genes têm sido amplamente comprovados como elementos importantes na carcinogênese colorretal, em especial os genes APC, K-ras, prognóstico à detecção de numerosas mutações em cada um deste genes, sugerindo

que o conhecimento da biologia molecular de cada tumor individualmente irá representar um papel importante no diagnóstico e tratamento destes pacientes.

5. Quais as perspectivas a curto prazo do impacto da análise da biologia molecular dos tumores colorretais?

A velocidade dos avanços ocorridos nesta área é impressionante, possivelmente sem igual em qualquer outro momento da história da medicina. Estes avanços não se restringem à crescente demonstração de que o comportamento biológico de cada tumor é conseqüência direta das alterações genéticas que o provocaram. Além disto, o desenvolvimento de métodos mais precisos e simplificados para a realização destes estudos leva a crer que em muito breve estes exames estarão sendo realizados de rotina nos laboratórios de nossos hospitais e clínicas. Como um exemplo deste avanço podemos citar o desenvolvimento dos chamados "biochips", através dos quais poderemos realizar de forma rápida e precisa a pesquisa de centenas ou milhares de mutações diferentes através da leitura em microscópio ótico de uma lâmina especial colocada em contato com uma amostra do tumor, previamente tratada.

Além do importante papel que a biologia molecular venha a desempenhar no tratamento do câncer colorretal, também o diagnóstico precoce de lesões neoplásicas sofrerá radicais transformações com grande aumento da acurácia. Hoje o diagnóstico precoce através dos exames de fezes se baseia na pesquisa de sangue oculto em decorrência de lesões polipóides benignas ou malignas, o que pressupõe um mínimo de crescimento tumoral superior à capacidade de neoformação vascular. Empregando técnicas de biologia molecular, diversos estudos têm demonstrado a viabilidade de detecção realmente precoce de lesões neoplásicas da mucosa colorretal através da pesquisa de mutações em células descamadas obtidas a partir das fezes em indivíduos assintomáticos, multiplicando em muito a detecção de lesões em estágio bastante inicial.

Assim sendo, o panorama atual sugere que o estudo da genética e biologia molecular venha a se tornar brevemente não apenas um mero exercício teórico de compreensão da fisiopatologia do câncer colorretal, mas também um importante instrumento clínico no diagnóstico e tratamento desta doença.