

ESTADIAMENTO MOLECULAR DO CÂNCER COLORRETAL: O FUTURO SE APROXIMA

¹MAURO DE SOUZA LEITE PINHO

¹*Hospital Municipal São José, Joinville, Santa Catarina, Brasil*

PINHO MSL. Estadiamento Molecular do Câncer Colorretal: O Futuro se Aproxima. **Rev bras Coloproct**, 2005;25(3): 279-284.

RESUMO: Embora grandes avanços tenham ocorrido nas últimas décadas com o objetivo de melhor correlacionar o estágio de evolução do câncer colorretal com as probabilidades de recorrência, persiste até hoje uma elevada margem de insegurança quanto à efetividade do tratamento realizado, não raramente contrariando avaliações prognósticas inicialmente favoráveis. As tentativas de avaliação prognóstica apresentam a grave limitação de restringirem-se à observação da morfologia tumoral, não fornecendo, necessariamente, informações sobre o potencial comportamento biológico do tumor, o qual está relacionado aos mecanismos intrínsecos de funcionamento das células componentes daquele tecido. O desenvolvimento de novos métodos de análise da expressão gênica, em particular através da técnica de microarrays, permitiu a observação da expressão gênica de milhares de genes de forma simultânea, tornando possível a identificação do perfil genômico dos diferentes tecidos e permitindo uma correlação com seu comportamento biológico. Estudos recentes demonstraram a possibilidade de predição do status linfonodal em tumores colorretais primários, a partir da análise de seu perfil genômico tumoral através da técnica de microarrays. Outros estudos utilizando esta mesma técnica tem permitido a identificação de conjuntos de genes, denominados como assinatura genética, cuja expressão evidenciou um valor prognóstico relacionado à recorrência e sobrevida superior ao método convencional de estadiamento tumoral, através da classificação de Dukes e suas variações. Estes resultados sugerem uma perspectiva bastante favorável em direção a um histórico salto de qualidade no que diz respeito ao melhor conhecimento e avaliação prognóstica do câncer colorretal.

Descritores: Câncer colorretal; biologia molecular; fatores prognósticos

INTRODUÇÃO

Dentre o amplo espectro de características desfavoráveis do câncer destaca-se seu caráter de grande imprevisibilidade quanto ao prognóstico do paciente, independentemente da qualidade do tratamento instituído. Embora grandes avanços tenham ocorrido nas últimas décadas com o objetivo de melhor correlacionar o estágio de evolução da doença com as

probabilidades de recorrência, persiste até hoje uma elevada margem de insegurança quanto à efetividade do tratamento realizado, não raramente contrariando avaliações prognósticas inicialmente favoráveis.

Ao longo deste percurso histórico, praticamente todos os aspectos epidemiológicos, clínicos ou morfológicos foram correlacionados ao comportamento biológico do câncer colorretal numa tentativa de estabelecer critérios prognósticos

Trabalho realizado pelo Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, Joinville, Disciplina de Clínica do Departamento de Medicina da UNIVILLE

Recebido em 24/08/2005

Aceito para publicação em 15/09/2005

confiáveis. A observação da idade ou sexo do paciente, a localização e volume do tumor, assim como sua forma de apresentação clínica mostraram-se insatisfatórios para atingir estes objetivos. Bastante mais precisos, os aspectos microscópicos tumorais revelaram um valor prognóstico mais confiável, obtendo-se uma melhor correlação entre os índices de recorrência ou sobrevida e a análise do grau de diferenciação tumoral, presença de mucina, invasão angiolímfática e infiltrado linfocitário. Apesar de todos estes avanços, no entanto, persistem até hoje os estudos pioneiros de Dukes ¹ a respeito da análise locorregional de infiltração tumoral e pesquisa de metástases linfonodais, como o padrão ouro para estabelecimento do prognóstico do paciente, embora tenha esta classificação sofrido algumas modificações até o padrão TNM atualmente aceito de forma consensual, preservando no entanto seus princípios básicos.

Entretanto, todas estas tentativas de avaliação prognóstica apresentam a grave limitação de restringirem-se à observação da morfologia tumoral, mesmo a nível microscópico. Desta forma, a obtenção de um registro momentâneo da evolução tumoral não irá fornecer, necessariamente, informações sobre o potencial comportamento biológico do tumor, o qual está relacionado aos mecanismos intrínsecos de funcionamento das células componentes daquele tecido.

Os estudos de biologia molecular do câncer, realizados nos últimos anos, demonstraram que estes mecanismos referem-se na verdade a diversas ações nas funções de proliferação celular, correção de reparos no DNA, disponibilidade de suprimento sanguíneo pela angiogênese, elementos de adesão e mobilidade das células, entre outras ^{2,3}.

Sem o conhecimento dos mecanismos da carcinogênese que irão determinar o funcionamento das células de cada tecido tumoral individualmente, qualquer observação morfológica restringir-se-á a uma análise retroativa do caminho percorrido até aquele determinado estágio. Obtidas estas informações, será estabelecida uma avaliação prognóstica baseada em comparação com dados estatísticos oriundos de séries históricas, as quais incluem um grande número de casos. Embora representando ainda nossa principal ferramenta para uma avaliação da gravidade de cada caso, é importante que tenhamos em mente que estes dados estatísticos referem-se a uma média da evolução de tumores com mecanismos de carcinogênese distintos

entre si, incluindo conseqüentemente um importante viés que reduz consideravelmente a confiabilidade do referido prognóstico.

FUNCIONAMENTO CELULAR: GENES E PROTEÍNAS

Sabemos que as proteínas representam o principal grupo de moléculas responsáveis pela estrutura e funcionamento das células normais ou patológicas. Desde a formação do citoesqueleto até a complexa sinalização que permite uma perfeita sincronia de ações internas e externas da célula, milhares de proteínas atuantes no núcleo, citoplasma ou membrana celular desempenham funções de grande relevância, podendo, em casos de até uma única anormalidade, levar a falhas que irão eventualmente resultar em graves distúrbios teciduais.

Sendo estas proteínas sintetizadas a partir da transcrição de sua respectiva sequência gênica contida na molécula de DNA nuclear, vemos então que eventuais anormalidades destes genes poderão resultar em uma ação celular alterada. Desta forma, poderemos observar tais alterações tanto a partir da análise dos genes obtidos a partir do DNA tecidual, como pelo estudo das proteínas expressas no referido tecido.

Estima-se hoje, a partir dos estudos incluídos no Projeto Genoma Humano, que cada molécula de DNA contenha cerca de 40 000 genes, os quais seriam responsáveis pela codificação de um número ainda indeterminado de proteínas. Embora o DNA nuclear, contido em cada célula somática do corpo humano, seja exatamente o mesmo independentemente de sua localização nos mais diversos tecidos, o padrão de ativação destes genes para a síntese das respectivas proteínas (expressão gênica) é variável, sendo responsável então pela grande variabilidade celular existente entre estes tecidos. Como exemplo, embora as células hepáticas contenham em seu DNA os genes responsáveis pela codificação e expressão de proteínas, como a insulina ou o glucagon, estes não serão ali ativados, o que somente irá ocorrer nas células pancreáticas.

De uma forma geral, estima-se que apenas cerca de 10 000 genes em cada célula serão passíveis de ser ativados para expressão gênica e, sendo estes diferentes para cada tecido, irão conseqüentemente determinar a estrutura e funcionamento de suas

respectivas células. A isto denominamos perfil genômico, o qual será então responsável pelo respectivo perfil proteico desta célula.

Da mesma forma pela qual estes perfis genômicos ou proteicos irão determinar a estrutura e comportamento biológico dos tecidos normais, o mesmo ocorrerá nos tecidos patológicos como os tumores.

CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS: QUAL A DIFERENÇA?

As primeiras aplicações das técnicas de biologia molecular à oncologia tiveram por objetivo fazer uma comparação entre células normais e tumorais em relação à expressão de alguns genes isolados, como p53, k-ras e muitos outros^{4,7}. À medida que novos genes e seus respectivos produtos proteicos foram progressivamente sendo descobertos, tornou-se evidente que o processo de carcinogênese está associado não apenas à alteração de uns poucos genes, mas a uma complexa relação entre centenas ou possivelmente milhares de genes distintos, atuando através de suas respectivas proteínas sobre diferentes etapas do funcionamento celular.

O desenvolvimento de novos métodos de análise da expressão gênica, em particular através da técnica de microarrays, a qual utiliza o princípio da hibridização do RNA mensageiro, permitiu a observação da expressão gênica de milhares de genes de forma simultânea. Desta forma, tornou-se possível a identificação do perfil genômico dos diferentes tecidos, demonstrando quais proteínas estão atuando em suas células e permitindo uma correlação com seu comportamento biológico⁸.

Uma vez disponível esta ferramenta, diversos autores realizaram estudos visando identificar grupos de genes cujas alterações estivessem associadas a anormalidades teciduais, buscando assim estabelecer uma relação entre causa e efeito. Em relação ao câncer colorretal, foram comparadas inicialmente as expressões gênicas entre mucosa colônica normal e adenocarcinomas. Através destas comparações, Takemasa e cols⁹ identificaram 59 genes com expressão gênica diferenciada entre um total de 4608 estudados, enquanto Stremmel e cols¹⁰ observaram diferenças entre 100 a 500 genes entre mais de 6000 analisados. Seguindo uma metodologia semelhante, Kitahara e cols¹¹ relataram uma expressão diferente

entre tecido normal e patológico em 235 genes em um total de 9126 estudados.

Além das diferenças entre tecidos normais e patológicos, outros autores buscaram identificar eventuais alterações de expressão gênica entre graus diferentes na doença neoplásica. Lin e cols¹² identificaram um grupo de 50 genes entre 23 040 estudados, os quais foram utilizados como escore para distinguir entre adenomas e adenocarcinomas colorretais. Por outro lado, Hegde e cols¹³ observaram em adenocarcinomas colorretais metastáticos uma expressão diferenciada em 176 genes entre 19200 analisados, sugerindo que estes estejam relacionados a este pior comportamento biológico.

EXPRESSÃO GÊNICA X METÁSTASES LINFONODAIS

Uma das questões mais relevantes referentes à indicação cirúrgica no câncer colorretal refere-se à impossibilidade de predição da presença de metástases linfonodais, durante a avaliação pré-operatória de um tumor primário. Apesar de grandes avanços em métodos de imagem, como a endossônografia e a ressonância magnética, persistem as dificuldades no sentido de estabelecer-se a probabilidade de existência de disseminação linfática, levando eventualmente à necessidade de ressecções mais extensas em lesões localizadas a fim de obter-se um estadiamento mais adequado.

Croner e cols¹⁴ realizaram um estudo visando avaliar a possibilidade de predição do status linfonodal em tumores colorretais primários, a partir da análise de seu perfil genômico tumoral através da técnica de microarrays. Para alcançar este objetivo, foram identificados 50 genes com maior potencial preditivo cuja expressão foi comparada entre espécimes tumorais sem metástases linfonodais (estágio I e II) e um grupo semelhante com metástases linfonodais (estágio III). A adição deste método de avaliação acrescentou um benefício relevante na análise do status linfonodal, cujo valor preditivo alterou-se de 53% a 61% obtido com os métodos convencionais para 65% a 70% após a inclusão dos resultados dos exames de microarray. Baseados nestes resultados, os autores concluem que este procedimento poderá futuramente ser incluído como forma de análise a partir de biópsias pré-operatórias, possibilitando uma maior confiabilidade

à predição da existência de metástases linfonodais no câncer colorretal.

ESTADIAMENTO MOLECULAR: DUKES E TNM FINALMENTE SUPERADOS?

Seguindo-se à previsível evolução a partir da sequência de trabalhos apresentada acima, Eschrich e cols¹⁵ publicaram, em maio do corrente ano, os resultados de um interessante estudo cujos resultados podem vir a representar um verdadeiro marco na história da oncologia cirúrgica.

Inicialmente, destacam que enquanto a classificação proposta por Dukes e suas subsequentes modificações possibilitam informações prognósticas bastante confiáveis para os graus A e D, são pouco úteis para os estágios intermediários B e C. Além disso, esta classificação não pode ser aplicada até que seja realizada a ressecção completa da lesão neoplásica, incluindo uma adequada linfadenectomia.

Em seguida, apresenta a tecnologia baseada em microarrays, como tendo sido já utilizada em tumores de mama e linfomas com bons resultados para a predição de sobrevida dos pacientes¹⁶⁻¹⁸, destacando o fato de que, ao contrário das outras utilizadas até o momento, esta avaliação prognóstica pode ser realizada no momento do diagnóstico do tumor a partir de uma biópsia, partindo-se da hipótese de que qualquer fragmento deste tumor já irá conter as informações necessárias para predizer seu comportamento biológico.

Para a realização de seu estudo, os autores selecionaram 78 casos de tumores colorretais com um seguimento mínimo de 36 meses, subdivididos entre sobreviventes (grupo bom prognóstico) e não sobreviventes (grupo mau prognóstico). Estas amostras tumorais foram então submetidas a um sofisticado estudo estatístico, baseado em achados de microarray, no qual foi feita uma análise da expressão de 31.872 genes com o objetivo de selecionar aqueles genes com maior potencial de diferenciação para bom ou mau prognóstico.

A partir desta análise estatística, os autores identificaram um conjunto de 43 genes cuja expressão melhor correlacionou com o tempo de sobrevida. O potencial discriminativo deste conjunto de genes para os grupos de sobreviventes ou não sobreviventes foi comparado com a efetividade prognóstica da classificação de Dukes. Conforme observamos na Figura-1, a análise baseada neste estadiamento molecular foi altamente significativa ($p < 0.001$) enquanto a classificação de Dukes mostrou-se ineficaz para este propósito ($p = 0.2$). A acurácia da classificação molecular para predizer o prognóstico destes pacientes para uma sobrevida de 36 meses foi de 90%, com uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 84%.

Visando validar esta classificação, os autores reproduziram este estudo em uma série de amostras obtidas de um outro grupo de 95 pacientes portadores de câncer colorretal integrantes de um banco de dados da Dinamarca. Neste estudo, o número de genes analisados (assinatura genética) foi reduzido de 43

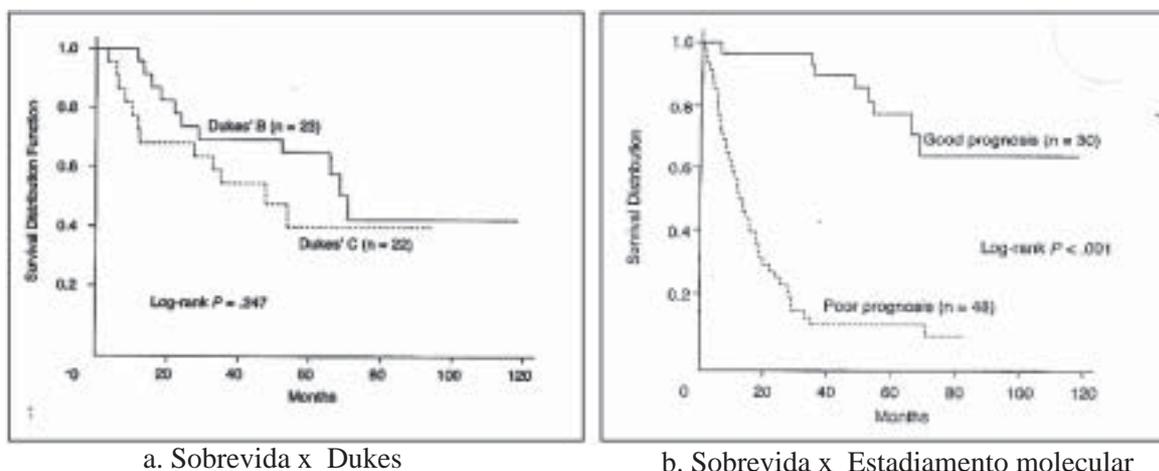


Figura 1 – Análise comparativa entre os grupos de sobreviventes e não sobreviventes em 36 meses através da classificação de Dukes ($p = 0.2$) e o estadiamento molecular ($p < 0.001$) utilizando-se um conjunto de 53 genes com maior poder discriminativo.

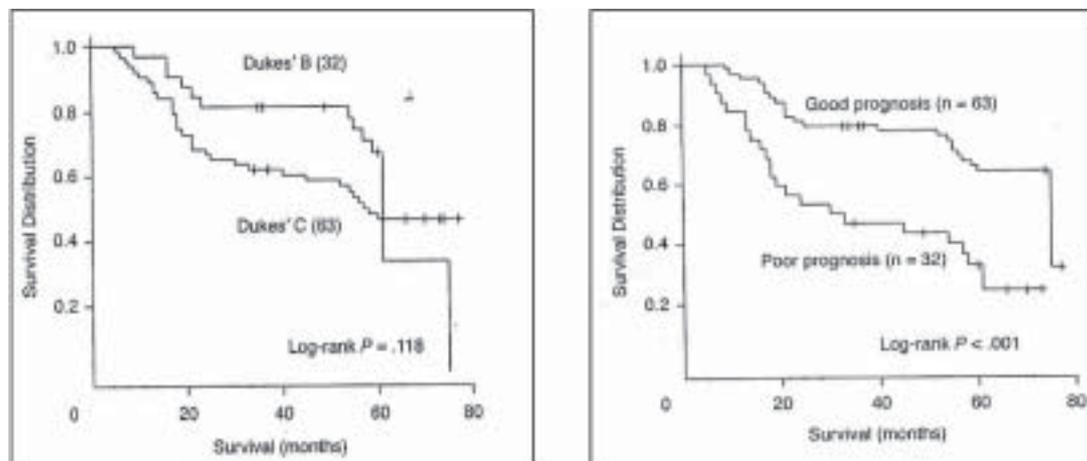
para 26 genes. Novamente, mesmo utilizando este número menor de genes, o estadiamento molecular mostrou-se muito mais efetivo na predição prognóstica de sobrevida ($p=0.001$) quando comparado à classificação de Dukes ($p=0.11$), conforme demonstrado na Figura-2.

Baseados nestes achados, os autores sugerem que este sistema de estadiamento molecular, através da pesquisa da assinatura genética, apresentou-se superior à forma convencional de avaliação do prognóstico baseado nos achados morfológicos utilizados pela classificação de Dukes e suas modificações subsequentes. Como primeira aplicabilidade desta classificação, sugerem uma indicação mais acurada para a quimioterapia, de forma a evitar tratamentos desnecessários ou sua não indicação em casos de pior prognóstico não detectado através do estadiamento convencional.

Este trabalho reforça os resultados publicados por Wang e cols¹⁹ em 2004, os quais relataram uma acurácia de 78% na predição de recorrência em um

grupo de 36 pacientes portadores de câncer colorretal estadiados como Dukes B. Ao utilizar o mesmo procedimento através da pesquisa de uma assinatura genética tumoral incluindo 23 genes, os autores foram capazes de prever a recorrência em 13 dos 18 pacientes que apresentaram recorrência (72%) e a ausência de recorrência em 15 dos outros 18 pacientes que evoluíram bem (83,3%).

Assim sendo, parece-nos que estes resultados recentes, embora ainda necessitando de confirmação através de estudos adicionais, sugerem uma perspectiva bastante favorável em direção a um histórico salto de qualidade no que diz respeito ao melhor conhecimento e avaliação prognóstica do câncer colorretal. Mais do que nunca, portanto, é necessário que este seja um tema considerado de grande relevância entre aqueles que se dedicam ao tratamento do câncer colorretal, a fim de que possamos, em um menor prazo possível, transformar estes avanços na área da pesquisa em biologia molecular em verdadeiros benefícios no tratamento de nossos pacientes.



a. Sobrevida x Dukes

b. Sobrevida x Estadiamento molecular

Figura 2 – Análise comparativa da sobrevida através da classificação de Dukes ($p=0.1$) e o estadiamento molecular ($p<0.001$) utilizando-se um conjunto de 26 genes previamente selecionados a partir do estudo anterior.

SUMMARY: Despite great advances occurred over the last decades concerning prognostic evaluation of colorectal cancer after surgical treatment, a high rate of failures is still observed. Based on macroscopic or microscopic morphological assessment, these prognostic staging have the drawback of not taking in account the individual tumor biological behaviour. Development of microarray essays to identify individual tumour gene expression profiles has contributed for a better prediction of the risk of recurrence and survival. Recent studies using these techniques have demonstrated a highly significant correlation to lymph node status. Furthermore, a significant benefit of gene expression microarray assessment in survival prediction compared to conventional Dukes classification has provided an encouraging route towards a more accurate prognostic evaluation and consequent improved results in the treatment of colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer; molecular biology; prognostic factors

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dukes C. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 35:323, 1932.
2. Pinho M. *Biologia Molecular do Câncer*. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
3. Rossi BM, Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo:Lemar, 1999.
4. Adell G, Sun XF, Stal O, Klintonberg C, Sjodahl R, Nordenskjöld B. p53 status: an indicator for the effect of preoperative radiotherapy of rectal cancer. *Radiother Oncol* 1999 May;51(2):169-74
5. Wang Q, Zhao P, Hu Y, Yang G. Prognostic significance of P53 protein expression in patients with colorectal adenocarcinoma. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao* 1998 Jun;29(2):182-4
6. Pinho M. Proteína p53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? *Rev Bras Coloproctol* 2000; 20:258-260.
7. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003 Apr;24(4):703-10.
8. Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res*. 2003 Mar;9(3):931-46.
9. Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, Sekimoto M, Tomita N, Nakamori S, Matoba R, Monden M, Matsubara K.. Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3;285(5):1244-9.
10. Stremmel C, Wein A, Hohenberger W, Reingruber B. DNA microarrays: a new diagnostic tool and its implications in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2002 May;17(3):131-6.
11. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Tsunoda T. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res*. 2001 May 1;61(9):3544-9.
12. Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, Nakamura Y. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene*. 2002 Jun 13;21(26):4120-8.
13. Hegde P, Qi R, Gaspard R, Abernathy K, Dharap S, Earle-Hughes J, Gay C, Nwokekeh NU, Chen T, Saeed AI, Sharov V, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray. *Cancer Res*. 2001 Nov 1;61(21):7792-7.
14. Croner RS, Peters A, Brueckl WM, Matzel KE, Klein-Hitpass L, Brabletz T, Papadopoulos T, Hohenberger W, Reingruber B, Lausen B. Microarray versus conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005 Jul 15;104(2):395-404.
15. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, Coppola D, Kruhoffer M, Aaltonen L, Orntoft TF, Quackenbush J, Yeatman TJ. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3526-35.
16. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*. 2002 Jan;8(1):68-74.
17. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
18. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
19. Wang Y, Jatke T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1564-71.

Endereço para correspondência:

MAURO PINHO
Rua Palmares 380
Joinville, Santa Catarina
Cep. 89203-230