

Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento

Molecular Biology of Colorectal Cancer: A Silent Revolution

MAURO DE SOUZA LEITE PINHO¹

¹ *Professor da Disciplina de Clínica Cirúrgica da UNIVILLE, Joinville, SC.
Cirurgião do Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, Joinville, SC - Brasil.*

PINHO MSL. Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento. *Rev bras Coloproct*, 2008;28(3): 353-368.

RESUMO: Embora os estudos sobre biologia molecular permaneçam como a principal expectativa para o surgimento de novos conceitos e recursos para o tratamento do câncer colorretal, a ausência de resultados de real impacto do ponto de vista clínico ao longo dos últimos anos podem representar uma frustração para quem não esteja acompanhando de perto a evolução das pesquisas nesta área. Assim sendo, nosso objetivo no presente texto é apresentar uma breve revisão do caminho percorrido até o momento desde os trabalhos pioneiros sobre carcinogênese colorretal até as pesquisas mais recentes sobre proteômica, demonstrando assim o constante fluxo de grandes avanços os quais possibilitam uma previsão realista a curto ou médio prazo da disponibilização de recursos de amplo impacto, com potencial para alterar de forma relevante os resultados do tratamento desta importante doença.

Descritores: Câncer colorretal; biologia molecular.

Apesar de ser um tema relativamente complexo para aqueles que atuam na prática clínica, é um verdadeiro consenso a expectativa de que os estudos baseados em biologia molecular venham a oferecer os necessários avanços na compreensão da fisiopatologia, do diagnóstico e do tratamento do câncer. Talvez em decorrência desta expectativa, temos freqüentemente a frustrante sensação de que apesar do grande volume de pesquisas realizadas ao longo dos últimos anos, permanecemos ainda distantes da obtenção de resultados relevantes capazes de transformar estas esperanças em uma realidade para nossos pacientes.

Assim sendo, é nosso objetivo nesta Seção demonstrar que embora os resultados não tenham ainda atingido nossa prática diária, importantes avanços permanecem ocorrendo, contribuindo para o esclarecimento gradual do complexo mosaico representado

pelo processo de carcinogênese, o que certamente apresentará um grande impacto sobre a medicina do terceiro milênio. Para melhor demonstrar estes avanços, apresentaremos aqui uma breve revisão do caminho percorrido até o momento através dos estudos em biologia molecular aplicada ao câncer.

Biologia molecular: uma potente ferramenta

Ao contrário de outras linhas de estudos dedicadas ao esclarecimento dos aspectos oncológicos como a imunologia ou a microbiologia, a biologia molecular representa a aquisição de uma ampla e abrangente gama de ferramentas geradas a partir de um grande desenvolvimento biotecnológico, as quais nos permitem a identificação e manipulação das biomoléculas que os compõem. Assim sendo, trata-se na verdade do processo de entrada em um amplo uni-

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Disciplina de Clínica Cirúrgica do Departamento de Medicina da UNIVILLE, Joinville, SC e Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, Joinville, SC - Brasil.

Recebido em 18/08/2008

Aceito para publicação em 20/08/2008

verso ainda inexplorado no qual situam-se por certo muitas das respostas por nós perseguidas ao longo da história da Medicina.

Câncer colorretal: os primórdios de um modelo de carcinogênese

O primeiro grande passo da biologia molecular na compreensão da carcinogênese ocorreu exatamente nos estudos sobre o câncer colorretal. Isto foi possibilitado através dos trabalhos pioneiros de Vogelstein¹ e seu grupo analisando a variação da expressão gênica na seqüência adenoma-carcinoma. A partir destes estudos foi possível identificar que a degeneração de um tecido normal até o surgimento de um câncer ocorria em conseqüência de um acúmulo de mutações de genes expressando proteínas com ação sobre o ciclo celular. Destes estudos emergiu a seqüência de mutações dos genes APC – k-ras – DCC – p53, cuja imagem mais emblemática foi representada como na Figura 1, amplamente divulgada e que representou um importante passo inicial da compreensão do potencial dos estudos de biologia molecular na carcinogênese.

A compreensão da complexidade da carcinogênese

Embora os conceitos acima citados tenham sido de grande valor didático, tornou-se logo evidente sua excessiva simplicidade devido à demonstração de que a referida seqüência APC/k-ras/DCC/p53, compreendia não apenas um número extremamente reduzido de genes/proteínas envolvidas no processo de carcinogênese, mas também contemplavam apenas um aspecto desta, representada pelo distúrbio proliferativo.

De fato, a crescente disponibilidade de ferramentas de biologia molecular tornou claro a coexistência de diversos processos desde a ocorrência de um desequilíbrio do ciclo celular em uma célula até o desenvolvimento de um tecido neoplásico com características invasivas. Conforme demonstrado na Figura 2, a ativação de um processo local de angiogênese para desenvolvimento tumoral, seguida da penetração na membrana basal e demais tecidos são elementos fundamentais para que a metastatização ocorra através de uma invasão e migração através dos vasos endoteliais levando a uma colonização de tecidos à distância.

A correlação entre os aspectos histológicos e a expressão das diferentes proteínas demonstrou que cada uma destas etapas é mediada por um grande nú-

mero de moléculas protéicas desempenhando funções específicas como crescimento de vasos endoteliais, alterações do citoesqueleto, digestão de membranas, adesão celular, etc. Alguns exemplos desta correlação entre proteínas e as respectivas etapas da carcinogênese² estão demonstrados na Tabela 1.

Microarrays: a visão global da expressão tecidual

Sabendo-se que cada tecido, normal ou não, tem o seu comportamento biológico determinado pelas proteínas presentes em sua composição a partir da expressão de seus respectivos genes, tornou-se necessária uma forma de determinar quais genes estão expressos (ativados) em cada tumor. Para isto, não bastaria a simples identificação do gene, pois estes estão

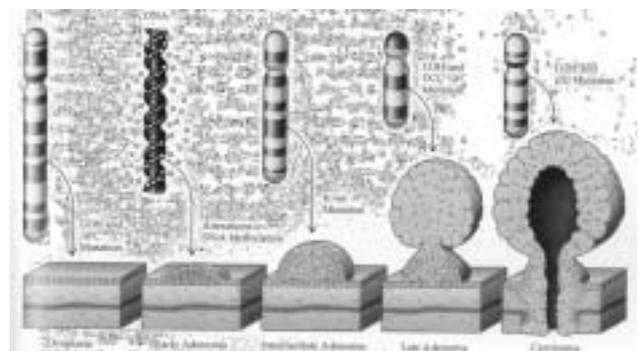


Figura 1 - Modelo proposto por Vogelstein e cols para a seqüência de mutações na evolução adenoma-carcinoma (Extraído de Weimberg RA e Hanahan DS in: Molecular Oncology, Scientific American Inc. 1996:New York, pg 187).



Figura 2 - Etapas da carcinogênese e formação de metástases.

presentes em todas as células do corpo, mesmo não sendo expressos.

Considerando-se que a síntese protéica passa necessariamente pela formação de uma molécula de RNA mensageiro (RNAm) a qual irá fazer uma tradução em proteína posteriormente no ribossomo, conforme demonstrado na Figura 3, foi desenvolvido um método de análise da expressão gênica tecidual através da extração e identificação das moléculas de RNAm presentes. Esta técnica, denominada como *microarray* (microseqüências), apresenta a grande vantagem de avaliar a ativação de milhares de genes simultaneamente, independentemente de sua função, formando assim um painel demonstrativo do provável comportamento biológico tumoral³.

Estadiamento molecular: um passo adiante

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

Tabela 1 - Etapas da carcinogênese e proteínas envolvidas.

Etapa	Proteínas
Proliferação celular	Ciclinas A, B, D1, E p15 p27 K-ras P53
Angiogênese	Bcl-2, etc VEGF COX-2
Invasão	FGF, etc Filamina Vilina Laminina Fibronectina Colágeno, etc
Migração	Lectinas Integrinas Caderinas Catepsina Metaloproteases, etc

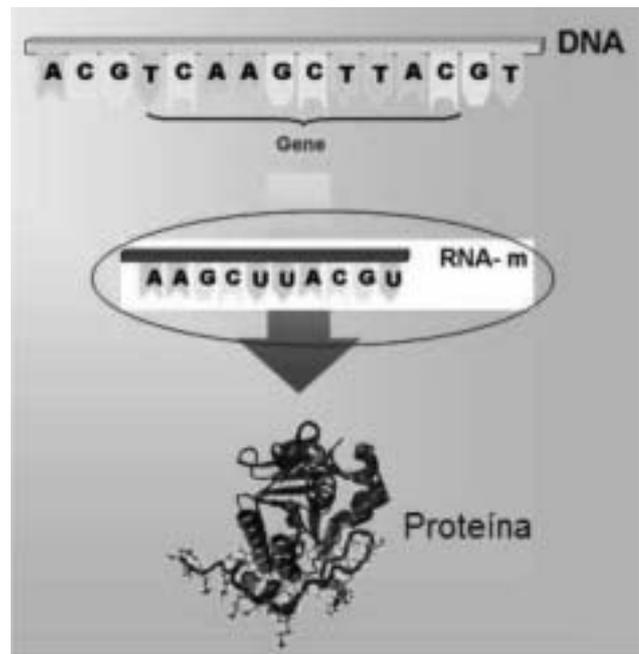


Figura 3 - Etapas da síntese protéica.

adenocarcinomas. Através destas comparações, Takemasa e cols⁴ identificaram 59 genes com expressão gênica diferenciada entre um total de 4608 estudados, enquanto Stremmel e cols⁵ observaram diferenças entre 100 a 500 genes entre mais de 6000 analisados. Seguindo uma metodologia semelhante, Kitahara e cols⁶ relataram uma expressão diferente entre tecido normal e patológico em 235 genes em um total de 9126 estudados.

Utilizando este princípio, Croner e cols⁷ identificaram 50 genes os quais permitiram uma maior acuidade para a predição de metástases linfonodais. Kim e cols⁸ identificaram um conjunto de 261 genes cuja expressão representou a diferença entre a ocorrência de resposta completa e incompleta em 31 pacientes submetidos à terapia neoadjuvante. Neste grupo, todos os quatro casos de resposta completa foram corretamente previstos (100%), assim como nove dos 11 casos de resposta parcial (82%).

Ghadimi e cols⁹, usando uma metodologia semelhante, identificaram um conjunto de 54 genes, cuja expressão foi capaz de diferenciar com 83% de acurácia os pacientes que apresentaram resposta à terapia neoadjuvante daqueles sem resposta (p=0.2).

Mas talvez o estudo mais representativo desta aplicação da técnica de *microarray* à análise do comportamento biológico do câncer colorretal tenha sido

aquele publicado por Eschrich e cols ¹⁰, os quais foram capazes de superar a classificação de TNM na acurácia da previsão da sobrevivência de 36 meses em 78 pacientes baseados na pesquisa da expressão de um conjunto de 43 genes.

Infelizmente, apesar destes resultados bastante promissores nas pesquisas, o estudo da expressão gênica tumoral através da técnica de *microarray* tem se mostrado, no entanto de difícil aplicabilidade na prática clínica, devido à sua complexidade, elevados custos e necessidade do congelamento imediato do tecido tumoral poucos minutos após sua ressecção, devido à labilidade das moléculas de RNAm.

Proteômica: a nova fronteira?

Apesar das dificuldades para estender os benefícios dos avanços acima relatados à prática clínica, novos e fascinantes horizontes tem sido abertos pela biologia molecular, em particular no que diz respeito aos estudos relacionados à *proteômica*.

Como vimos anteriormente, todas as células somáticas apresentam o mesmo DNA em seu núcleo, contendo os mesmos genes, os quais são no entanto ativados (ou expressos) de forma seletiva de acordo com o tecido e a função desempenhada. Estes genes sofrem um processo de *transcrição* em RNAm, o qual, por sua vez *é traduzido* em uma nova proteína. Estas proteínas irão então executar suas funções específicas, definindo o comportamento biológico da célula e do tecido no qual ela está inserida.

Por *proteômica* compreendemos os estudos que buscam relacionar a atividade tecidual ao conjunto de proteínas expressas em determinado momento. Ao contrário da *genômica*, onde pesquisamos genes ou RNAm, nos exames de proteômica buscamos identificar diretamente as proteínas presentes naquele tecido em questão.

Ao longo dos últimos anos, as análises teciduais proteômicas tem sido realizadas com o objetivo de evidenciar no tecido algumas das muitas proteínas já previamente identificadas, as quais podem ser observadas ao microscópio através da adição de anticorpos monoclonais marcados colorimetricamente. Este método, denominado como imunistoquímica, encontra-se já estabelecido como um procedimento de rotina para a maior parte dos laboratórios de anatomia patológica, sendo utilizado para diversas finalidades, desde a identificação da origem de um tecido metastático até a pesquisa de receptores celulares específicos para determinados medicamentos ¹¹. Apesar desta grande utili-

dade, a imunistoquímica permite a análise da expressão de apenas uma ou poucas proteínas de cada vez, impossibilitando portanto, a identificação de todo um conjunto de proteínas teciduais capazes de cobrir o espectro biológico de um tecido tumoral, o chamado *proteoma tumoral*.

Outra forma de identificar as proteínas expressas em um tecido, empregada mais em laboratórios de pesquisa, denomina-se Western Blotting, e baseia-se na análise de proteínas conhecidas separadas através de uma eletroforese, e posteriormente destacadas também pela adição de anticorpos monoclonais ³. Embora útil para pesquisas, sua complexidade e limites não tornam este método adequado para uso clínico.

Ao contrário destes métodos, que necessitam do conhecimento prévio das proteínas a serem identificadas, uma abordagem nova e revolucionária vem sendo estudada recentemente com resultados bastante interessantes. Esta se baseia na hipótese de que a atividade proteolítica tumoral irá liberar nos tecidos e no sangue fragmentos de proteínas, os quais, embora de composição desconhecida, poderão apresentar características similares em portadores da mesma doença. Para detectar estes fragmentos, foram desenvolvidos dois métodos de análise, denominados respectivamente de SELDI e MALDI, os quais detectam no san-

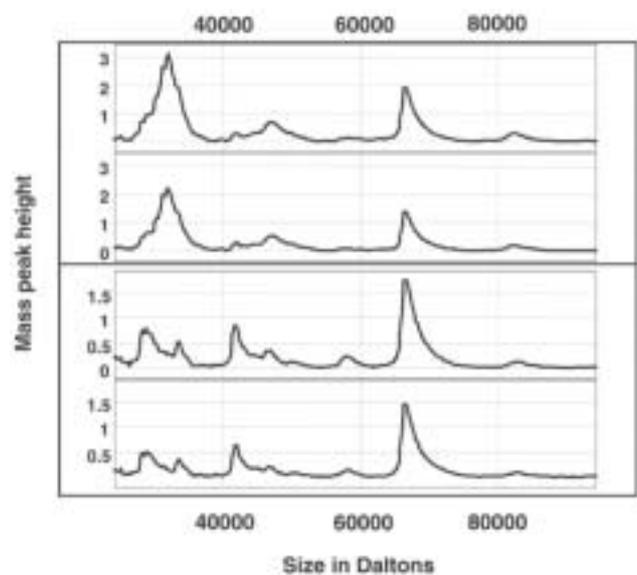


Figura 4 - Exemplo de gráfico resultante de uma análise sérica pelo método de SELDI, onde podemos observar a reprodutibilidade da detecção de picos de fragmentos proteicos de tamanho semelhante em diferentes amostras de pacientes portadores de câncer colorretal. (Extraído de Zheng e cols ¹²).

gue, urina ou nos tecidos a presença destes fragmentos protéicos através da espectrometria de sua massa, obtendo assim picos cuja reprodutibilidade em diversos pacientes portadores de uma mesma doença irá sugerir um padrão diagnóstico relacionado a esta, conforme demonstrado na Figura 4.

Embora a experiência com estes métodos seja ainda limitada, diversos estudos tem apresentados resultados bastante surpreendentes no sentido de obter elementos diagnósticos e prognósticos de alta precisão quando comparados aos métodos convencionais.

Três estudos¹²⁻¹⁴ analisando sangue de pacientes portadores de câncer colorretal e de controles, conseguiram fazer a diferenciação entre estes dois grupos através do método de SELDI com uma sensibilidade de 93%, 95 e 95%, respectivamente.

Xu e cols¹⁵, utilizando o mesmo método, foram mais específicos, e conseguiram prever o

estadiamento TNM das lesões tumorais ressecadas a partir de amostras de sangue com uma acurácia acima de 85%.

Ainda através da análise do sangue pela técnica de SELDI, Smith e cols¹⁶ obtiveram sucesso em identificar os pacientes que apresentaram uma resposta completa à terapia neoadjuvante com uma sensibilidade de 87%.

Desta forma, observamos que embora os resultados dos estudos sobre a biologia molecular do câncer colorretal, não sejam ainda claramente visíveis do ponto de vista clínico, inúmeros avanços têm sido realizados no sentido de uma melhor compreensão da doença, possibilitando uma previsão realista a curto ou médio prazo da disponibilização de recursos de amplo impacto, com potencial para alterar de forma relevante os resultados do tratamento desta importante doença.

ABSTRACT: Despite remaining as the main hope for emerging new concepts and strategies for treatment of colorectal cancer, the lack of results with clinical impact over the last years may contribute to frustrate those not entirely aware about current research data. So, the aim of this paper is to present a brief review since the first molecular biology studies in colorectal carcinogenesis until recent advances in proteomics, in order to demonstrate the consistent production of new data supporting a realistic expectancy for a near future availability of high impact resources that may change dramatically the results of treatment of colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer; Molecular biology.

REFERÊNCIAS

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
2. Pinho M. Biologia molecular do câncer – fundamentos para a prática médica. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, 2005.
3. Pinho M. Estadiamento molecular do câncer colorretal: o futuro se aproxima. *Revista Brasileira de Colo-Proctologia*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 279-284, 2005.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Croner RS, Peters A, Brueckl WM, Matzel KE, Klein-Hitpass L, Brabletz T, conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005 Jul 15;104(2):395-404.
8. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, Chang HJ, Ahn SA, Park HW, Jang SG, Park JH, Kim DY, Jung KH, Choi HS, Jeong SY, Sohn

- DK, Kim DW, Park JG. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007 Sep;50(9):1342-53.
9. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Füzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, Ried T. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1826-38.
10. 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.
11. Pinho M. Imunoistoquímica: o estudo da biologia molecular ao alcance de todos. *Revista Brasileira de Colo-Proctologia*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 188-191, 2005.
12. Zheng GX, Wang CX, Qu X, Deng XM, Deng BP, Zhang J. Establishment of serum protein pattern for screening colorectal cancer using SELDI-TOF-MS. *Exp Oncol*. 2006 Dec;28(4):282-7.
13. Liu XP, Shen J, Li ZF, Yan L, Gu J. A serum proteomic pattern for the detection of colorectal adenocarcinoma using surface enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Cancer Invest*. 2006 Dec;24(8):747-53
14. Ward DG, Suggett N, Cheng Y, Wei W, Johnson H, Billingham LJ, Ismail T, Wakelam MJ, Johnson PJ, Martin A. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cancer*. 2006 Jun 19;94(12):1898-905
15. Xu WH, Chen YD, Hu Y, Yu JK, Wu XG, Jiang TJ, Zheng S, Zhang SZ. Preoperatively molecular staging with CM10 ProteinChip and SELDI-TOF-MS for colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Mar;7(3):235-40
16. Smith FM, Gallagher WM, Fox E, Stephens RB, Rexhepaj E, Petricoin EF 3rd, Liotta L, Kennedy MJ, Reynolds JV. Combination of SELDI-TOF-MS and data mining provides early-stage response prediction for rectal tumors undergoing multimodal neoadjuvant therapy. *Ann Surg*. 2007 Feb;245(2):259-66

Endereço para correspondência:

Rua Palmares 380, Atiradores
Joinville, SC
89203-230
E-mail: mauro.pinho@terra.com.br