

## AS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CARCINOGENESE COLORRETAL (IV)

MAURO DE SOUZA LEITE PINHO - TSBCP  
BENEDITO MAURO ROSSI

---

Pinho MSL, Rossi BM - As proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal (IV). *Rev bras Coloproct*, 1998; 18(4): 278 - 282

---

Conforme visto na seção anterior, o epitélio intestinal está em constante estado de proliferação, o qual poderia ser resumido como um caminho a ser percorrido pelas células das criptas intestinais, as quais nascem no fundo da cripta e migram para a superfície seguindo um processo gradual de diferenciação. Após chegarem à superfície epitelial propriamente dita, estas células ficam expostas aos agentes carcinogênicos contidos na luz intestinal. Visando evitar os riscos de uma mutação que possa levar a um processo de malignização, estas células entram então em um processo de morte programada, denominada como *apoptose*.

Vimos ainda que todo este ciclo celular ocorre em conseqüência da ação de um grande número de proteínas as quais compõem a "programação" préestabelecida capaz de manter o equilíbrio entre o nascimento, ciclo proliferativo e morte celular.

O objetivo da presente seção será apresentar as características das principais proteínas envolvidas neste processo, as quais são ainda hoje reconhecidas como elementos fundamentais na carcinogênese colorretal.

### Proteína APC (Adenomatous Polyposis Coli)

Esta é uma proteína de fundamental importância, tendo representado o ponto de partida para os grandes avanços ocorridos no estudo da carcinogênese colorretal. Foi inicialmente descoberta a partir da identificação de um gene situado no cromossomo 5 o qual apresenta-se mutado em todos os casos de polipose adenomatosa familiar, sendo este conseqüentemente denominado gene APC. Esta mutação do gene APC é na verdade a 'marca genética' da polipose adenomatosa familiar e, sendo adquirida de forma hereditária, deve ser encontrada em todas as células do organismo do indivíduo. Além de serem responsáveis pela ocorrência desta doença hereditária, as mutações do gene APC e conseqüentemente seu produto (proteína APC) estão também intimamente relacionados à gênese das neoplasias colorretais não hereditárias, ou *esporádicas*, compreendendo desde os pequenos adenomas até as neoplasias malignas mais avançadas. Sabe-se ainda que a incidência de mutações do

complexo gene-proteína APC aumenta em relação direta com a progressão do processo neoplásico. Assim sendo, pequenos adenomas tubulares encontrados na mucosa colônica poderão apresentar alterações da proteína APC em cerca de 30% dos casos, podendo este número crescer em adenomas vilosos maiores, vindo a atingir mais de 80% nos casos de adenocarcinomas colorretais. Conforme veremos adiante, acredita-se hoje que a mutação do gene APC seja uma das etapas iniciais do processo seqüencial de mutações genéticas que alteram o equilíbrio entre o nascimento e a morte das células do epitélio colorretal levando ao surgimento do câncer.

Apesar de sua importância, não está ainda esclarecida a forma pela qual a proteína APC exerce sua função neste equilíbrio. Sabe-se que sua estrutura é composta por uma proteína de cerca de 300-kDa distribuída por toda a extensão celular, tanto no citoplasma como no núcleo e que tem uma expressão maior nas células mais maduras, uma vez que é observada com maior intensidade na extremidade superior das criptas intestinais. Sabe-se ainda que a função da proteína APC está associada à concentração das proteínas intracelulares alfa e beta-cateninas, as quais, como vimos acima, ligam-se à E-caderina para a adesão celular e comunicação intercelular. Além disto, tem sido demonstrado que o aumento da concentração da 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.

Resumindo, a proteína APC desempenha um papel crítico no equilíbrio do ciclo proliferativo do epitélio intestinal e sua disfunção resultante de mutações do gene APC, sejam estas herdadas ou adquiridas, representa possivelmente um dos primeiros fatores na cascata de alterações genéticas que levam ao surgimento das neoplasias colorretais.

### Proteína K-ras

Como foi dito acima, um dos fatores mais importantes na fisiologia do ciclo celular é a "comunicação" correta entre o meio extracelular e o núcleo da célula. Esta importância se deve à necessidade de ajustar este ciclo reprodutivo da célula ao meio tecidual ao qual ela está inserida. Para que isto ocorra, existe uma cadeia de elementos 'sinalizadores' os quais captam os sinais recebidos a partir de receptores situados na superfície da célula (membrana celular) fazendo a chamada *transdução*

do sinal através do citoplasma até o núcleo. Dentre estes elementos da cadeia citoplasmática destaca-se um grupo de proteínas conhecidas como proteínas *ras*, denominação esta oriunda do achado de mutações relacionadas a estas proteínas no desenvolvimento de sarcomas em ratos ('*RAI Sarcomas*). Neste grupo são identificados três subgrupos denominados *N-ras*, *Harvey-ras* (*H-ras*) e *Kirsten-ras* (*K-ras*), sendo este último mais freqüentemente citado devido ao seu freqüente envolvimento no surgimento dos tumores colorretais.

Os estudos até o momento sugerem que as proteínas *Ras* funcionam na verdade como um "interruptor" na cadeia membrana-núcleo de ativação do crescimento e diferenciação celular a partir de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, citoquinas, etc. Assim sendo, torna-se fácil a compreensão de que uma eventual mutação que transforme esta proteína em um "interruptor sempre ligado" irá representar um potente e permanente estímulo à proliferação celular. Por este motivo, o gene responsável pela produção da proteína *K-ras* (ou gene *K-ras*), situado no cromossomo 12, é considerado um proto-oncogene, o qual uma vez ativado transforma-se em um oncogene, ou seja, um gene cuja ativação representa um estímulo ao desenvolvimento de neoplasias.

De fato, sucessivos estudos têm demonstrado de forma bastante evidente que a proteína *K-ras* desempenha um papel relevante no surgimento das neoplasias colorretais. Kopreski e cols., por exemplo, demonstraram que 39% de um grupo de pacientes portadores de câncer colorretal apresentavam proteína *K-ras* mutante, enquanto nenhuma mutação destas foi evidenciada em indivíduos do grupo controle. De uma forma geral, considera-se que mutações da proteína *K-ras* são encontradas em cerca de 40% a 60% dos carcinomas colorretais ou adenomas maiores que 1 cm. Resumindo, o conjunto das informações existentes até o momento sugere 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, podendo 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 necessário.

### Proteína DCC (Deleted in Colorectal Cancer)

Esta é outra proteína aparentemente muito importante no processo de carcinogênese colorretal. Embora seja ainda tema de muitos estudos, sabe-se que esta proteína pode ser encontrada não apenas na mucosa colônica mas também em diversos outros tecidos do corpo, como sistema nervoso central e células do sistema retículo-endotelial. Sua descoberta (assim como seu nome) deve-se ao achado de que cerca de 70% dos tumores malignos colorretais apresentam uma mutação em um mesmo gene, situado no cromossomo 18, passando este conseqüentemente a ser considerado como um gene supressor de tumor. A partir da identificação deste gene, denominado como gene DCC, foi observado que seu produto, ou proteína

DCC, embora pertencendo à família das imunoglobulinas, desempenha uma importante função relacionada à adesão celular, sendo uma proteína transmembrana, ou seja, parte de sua estrutura atravessa a membrana para situar-se no meio extracelular. Estudos subseqüentes vêm colocando o complexo gene-proteína DCC em grande destaque ao demonstrar uma significativa correlação entre a concentração tumoral deste e o prognóstico do paciente. Gao e cols., por exemplo, demonstraram que pacientes portadores de câncer colorretal com metástases para linfonodos ou para o fígado apresentavam um número significativamente maior de mutações no gene DCC do que aqueles portadores de tumores em estágios mais precoces ( $p < 0,05$ ). Entretanto, talvez o estudo mais convincente sobre o valor prognóstico da mutação do gene DCC tenha sido relatado por Shibata e cols., os quais demonstraram que pacientes portadores de câncer colorretal estágio II apresentaram sobrevida de cinco anos significativamente mais freqüente nos casos em que a proteína DCC estava presente no tecido tumoral quando comparados aos pacientes cujos tumores não expressavam esta proteína (94,3% x 61,6%;  $p < 0,001$ ). Achado semelhante foi encontrado também nos pacientes portadores de tumores estágio III, cujos índices de sobrevida de cinco anos foram 59,3% e 33,2%, respectivamente ( $p = 0,03$ ). Embora outros autores tenham levantado questionamentos a respeito do 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. Caso esta hipótese seja confirmada, a dosagem direta da concentração da proteína DCC em tecido tumoral ou a pesquisa de mutações do gene DCC podem vir representar em breve um excelente auxílio na avaliação do prognóstico de pacientes portadores de câncer colorretal.

### Proteína p53 ("A guardiã do genoma")

Dentre todas as proteínas reconhecidamente envolvidas em processos de carcinogênese no organismo, esta é sem dúvida a de maior importância, e o adequado conhecimento desta proteína representa uma etapa primordial para todo aquele que deseja compreender os aspectos da biologia molecular relacionada ao câncer.

Identificada inicialmente em 1978, esta proteína é composta por uma molécula contendo 393 aminoácidos e seu nome deriva de seu peso molecular de 53.000 daltons ou 53 kD. É formada a partir da codificação contida no gene p53 situado no braço curto do cromossomo 17 (17p).

Para demonstrar sua importância podemos citar o fato de que mutações da proteína p53 são encontradas em cerca de 50% de todos os tumores malignos humanos, ou mais de 50 tipos de tumores, aí incluídos os tumores da bexiga, cérebro, mama, cérvix uterino, cólon e reto, esôfago, laringe, fígado, pulmões, ovários, pâncreas, próstata, pele, estômago e tireóide. Estas mudanças ocorrem em cerca de 40% dos casos no câncer de mama, 50% no câncer de pulmão e 70% no câncer colorretal. Em alguns casos, como o carcinoma pulmonar de

pequenas células, a proteína p53 está mutada em todos os casos, sendo esta mutação ainda responsável, quando adquirida de forma hereditária, pela Síndrome de Li-Fraumeni, a qual é uma doença familiar cujos membros portadores irão desenvolver tumores malignos invasivos em 50% dos casos até os 30 anos e mais de 90% até os 70 anos.

Mas, afinal, qual a função desta proteína cuja alteração representa um risco tão grande para o ser humano?

Ao longo dos últimos anos, numerosos estudos contribuíram para elucidar o que hoje conhecemos como o modelo de ação da proteína p53. Para que este modelo possa ser compreendido melhor, no entanto, cabe aqui uma breve recapitulação de alguns conceitos. Após um período inicial de repouso (G1) a célula entra em uma fase de síntese (fase S), durante a qual ocorre um processo de duplicação de seu conjunto de 23 pares de cromossomos, passando estes a um número de 46 visando a divisão celular posteriormente, o qual dará origem a duas células filhas com a mesma característica genética (conjunto de 23 pares de cromossomos em cada).

Entretanto, antes que esta divisão celular ocorra, a célula entra em novo período de repouso, a chamada fase G2. O objetivo desta fase de repouso é preparar a célula, agora com 46 pares de cromossomos (ou tetraplóide), para a mitose. Nesta "preparação", uma etapa fundamental corresponde à "checagem," geral do DNA duplicado, a fim de detectar eventuais problemas ocorridos durante a duplicação levando ao surgimento de defeitos ou mutações cromossômicas. Estes defeitos podem ser causados diretamente por fatores externos como a exposição a drogas ou radiações, ou internamente como falhas no próprio mecanismo mitótico. Estas alterações cromossômicas, uma vez transmitidas às células filhas poderão gerar conseqüências imprevisíveis, estabelecendo uma linhagem de células com genomas alterados os quais por sua vez darão origem a proteínas truncadas capazes de comprometer funções vitais do organismo. Torna-se assim essencial que a natureza tenha criado mecanismos capazes de detectar a ocorrência destes defeitos e mutações cromossômicas, assim como impedir sua transmissão para gerações celulares subsequentes. Segundo o modelo atualmente aceito, a proteína p53 desempenha exatamente esta função, ou seja, detectar as eventuais falhas existentes no DNA da célula prestes a se dividir e impedir que estas se propaguem à linhagem celular subsequente.

A base para a elaboração deste modelo originou-se principalmente nos seguintes achados:

a) A introdução da proteína p53 em células tumorais incapazes de produzi-la logrou bloquear o crescimento neoplásico e induzir a morte celular;

b) Enquanto os níveis celulares de p53 em células normais é extremamente baixo, a exposição desta célula a agentes lesivos ao DNA resultou em uma importante elevação da produção desta proteína;

A partir destes achados, estudos subsequentes demonstraram que a proteína p53, uma vez identificando a existência de uma anormalidade no DNA da célula em divisão, promove uma parada do ciclo celular na fase G2, durante a qual dois caminhos poderão ser seguidos, quais sejam o reparo da lesão

no DNA ou a indução da morte celular através do processo de apoptose (morte celular programada).

Assim sendo, torna-se fácil a compreensão dos motivos pelos quais a proteína p53 é denominada de "guardiã do genoma" uma vez que, embora não seja imprescindível para que ocorra a divisão celular, seu funcionamento inadequado irá expor o tecido celular em questão a um elevado risco de proliferação de anormalidades genéticas que poderão "fugir ao controle" manifestando-se na forma de doença neoplásica, como no caso da Síndrome de Li-Fraumeni. Por esta função, o gene p53 é classificado como um gene *supressor tumoral*, ou seja, seu bloqueio irá "permitir" o desenvolvimento de tumores.

Outro aspecto bastante interessante relacionado à proteína p53 em sua função de "vigilância" do material genético é a compreensão de que muitas drogas antineoplásicas tem na verdade seu efeito mediado através da ação da própria proteína p53. Ou seja, ao promover uma lesão no DNA esta droga irá gerar uma resposta da proteína p53 a qual irá induzir a morte celular por apoptose. Conseqüentemente, pacientes portadores de proteína p53 mutada, ou não funcionante, poderão apresentar uma maior resistência à ação de drogas antineoplásicas.

Sendo um elemento de crescente importância do ponto de vista clínico, sucessivos estudos têm contribuído para aprimorar os métodos de detecção da quantidade de proteína p53 existente em amostras teciduais normais ou em tumores. A partir destes estudos, dispomos hoje comercialmente de dois métodos principais, já abordados em outros capítulos anteriormente, quais sejam a imunohistoquímica e a pesquisa de mutações após amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Através da imunohistoquímica podemos obter uma visão direta através do microscópio da quantidade de proteína p53 existente nas células teciduais através de sua coloração por anticorpos específicos. Um aspecto importante a respeito deste exame é o fato de que, paradoxalmente, pacientes portadores de mutações no gene p53 deverão apresentar uma quantidade aumentada de proteína p53 corada nos tecidos. Isto se deve ao fato de que a proteína p53 normal apresenta uma meia-vida muito curta, não devendo então ser visualizada ao exame por imunohistoquímica. Por outro lado, pacientes portadores de mutações no gene p53 irão produzir uma proteína alterada, a qual, por não ser metabolizada, irá apresentar uma meia-vida mais prolongada, acumulando-se conseqüentemente nas células e sendo facilmente demonstrada à imunohistoquímica.

No que diz respeito à pesquisa de mutações no gene p53 pelo PCR, trata-se este de um método mais preciso por analisar especificamente a seqüência de pares de bases (A-T, G-C) existentes no gene em questão. Entretanto, por ser mais complexa e demorada sua utilização clínica é hoje ainda pouco viável, embora seja realizada de forma rotineira em centros específicos para estudos genéticos.

No que diz respeito especificamente ao câncer colorretal, a grande questão atual a respeito da proteína p53 refere-se à sua aplicabilidade clínica no diagnóstico e tratamento de portadores desta patologia. Um grande número de estudos tem sido realizado com o objetivo de determinar a exata incidência

de tumores colorretais associados a proteínas p53 defeituosas, situando-se esta incidência entre 40% e 70% na maior parte dos relatos. Estudos semelhantes realizados em adenomas de cólon e reto demonstram também um elevado índice de mutações da proteína p53, correlacionando-se de forma direta ao tamanho do pólo e ao grau de displasia encontrada.

Outro aspecto frequentemente estudado diz respeito à possibilidade de que a expressão tumoral de mutações da proteína p53 possa representar um elemento auxiliar na avaliação do prognóstico de pacientes portadores de câncer colorretal. De fato, embora existam ainda controvérsias a este respeito, numerosos estudos clínicos têm relatado uma correlação significativamente positiva demonstrando que tumores com elevada incidência de mutações na proteína p53 apresentam uma maior probabilidade de recidiva e menores índices de sobrevida.

Assim sendo, embora as outras proteínas apresentadas acima desempenhem também um importante papel na carcinogênese colorretal, a proteína p53 certamente se destaca como um elemento decisivo na compreensão deste processo e um grande número de evidências apontam para sua crescente utilização na prática clínica nos próximos anos.

### Proteínas de reparo ("Mismatch repair")

Este é um grupo de proteínas de grande importância. Como dissemos acima, a proteína p53 tem a função de reconhecer a ocorrência de uma mutação e bloquear a divisão desta célula a fim de impedir o surgimento de uma linhagem de células defeituosas, o que é feito através da indução da morte celular (apoptose) ou permitindo que seja realizado o reparo da alteração do DNA. Para que este reparo ocorra, no entanto, é necessário que existam estruturas específicas para esta finalidade, sendo esta então a função das chamadas proteínas de reparo. Até o momento cinco genes foram descritos como sendo capazes de sintetizar proteínas com a função de reparo do DNA, denominados respectivamente como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6, sendo este último identificado mais recentemente. Estas proteínas possuem a capacidade de remover um segmento de DNA contendo uma alteração na sequência de bases ATGC e inserir um novo segmento contendo a sequência certa, o que é feito baseado na sequência existente no "molde" da fita complementar do DNA.

Como veremos a seguir, as proteínas de reparo desempenham hoje um papel essencial na compreensão das alterações genéticas relacionadas à carcinogênese. Isto se deve ao fato de que a falha no funcionamento destas proteínas irá causar uma grande instabilidade no genoma, ou seja, os defeitos na sequência de pares de bases que ocorrem de forma aleatória na replicação do DNA não poderão ser reparados adequadamente, gerando um acúmulo de anormalidades genéticas que favorecem o surgimento do câncer.

Para uma melhor compreensão da importância das proteínas de reparo na carcinogênese, é conveniente que façamos aqui uma breve revisão sobre alguns conceitos relacionados a estas, particularmente no que diz respeito às estruturas denominadas como *microsatélites*.

Conforme já apresentado nas seções anteriores, a molécula de DNA consiste de uma gigantesca sequência compreendendo cerca de três bilhões de nucleotídeos (adenina, guanina, citosina, timina). Vimos ainda que ao longo desta molécula iremos encontrar segmentos cuja sequência de nucleotídeos (ou genes) irá funcionar como um 'molde' específico para a formação de cada uma das proteínas existentes no organismo humano.

O que nem sempre é adequadamente enfatizado é o fato de que menos de 10% da extensão de toda esta sequência de nucleotídeos é efetivamente composta por genes, ou seja, a enorme maioria de nosso material genético não apresenta uma função que tenha sido reconhecida até o momento, constando este de nucleotídeos situados ao longo da molécula de DNA entre os genes.

Outro aspecto importante é que 75% do genoma é composto por sequências denominadas como *cópia-única* ('single-copy DNA'), as quais serão encontradas em apenas um local dentro da molécula de DNA, ou eventualmente em alguns outros poucos locais. Por outro lado, os restantes 25% das sequências de nucleotídeos são caracterizadas como DNA repetitivo, ou seja, sequências de nucleotídeos que são encontradas de forma repetitiva ao longo do genoma podendo estas repetições ocorrerem até algumas milhares de vezes. Dentre estas sequências repetitivas encontram-se as chamadas *microsatélites* que são pequenas sequências, usualmente de extensão inferior a 10 pares de bases de nucleotídeos, situadas sem segmentos não codificantes de proteínas, e que são encontradas de forma dispersa em todo o genoma. A extensão destas sequências de microsatélites é variável entre os indivíduos, devendo no entanto ser exatamente a mesma em todas as células de uma mesma pessoa. A partir daí, foi então desenvolvido um teste através do qual o peso molecular das sequências de microsatélites é medido através de eletroforese, comparando-se amostras de células de tecido normal (esfregaço de mucosa oral por exemplo) com células tumorais. Caso haja diferenças entre os pesos moleculares dos microsatélites das duas amostras teremos uma demonstração de que ocorreram mutações nas sequências de microsatélites no tecido tumoral, com perda de nucleotídeos. A estas mutações dá-se o nome de *instabilidade de microsatélites*, sendo este um 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+*').

Conforme veremos adiante, a demonstração de erros de replicação em um tecido tumoral, ou RER (+), reveste-se hoje de grande importância clínica devido a dois aspectos principais:

- Tem sido amplamente demonstrado que tumores malignos colorretais RER (+) apresentam aspectos bastante característicos como uma tendência à localização em cólon direito e uma maior incidência em pacientes mais jovens. Além disto, embora estes tumores apresentem-se mais frequentemente como carcinomas pouco diferenciados e produtores de muco, sucessivos relatos referem melhores índices de sobrevida para pacientes portadores de câncer colorretal RER (+).

- Outro fato de grande relevância é o conhecimento de que determinadas famílias apresentam defeitos em genes formadores de proteínas de reparo, particularmente os hMSH2 e hMLH1, os quais são transferidos de forma hereditária. A herança destes defeitos determina o desenvolvimento de uma doença conhecida como *câncer colorretal hereditário não-polipóide* (mais conhecida pela sua sigla em inglês, HNPCC). Assim sendo, parece-nos importante mencionar aqui que o achado de um câncer colorretal RER (+) nos sugere fortemente a necessidade de investigar a possibilidade de que este paciente pertença a uma família de portadores de HNPCC. Isto se deve ao fato de que mais de 90% dos tumores colorretais em portadores de HNPCC apresentam-se RER (+), enquanto apenas cerca de 15% dos tumores malignos colorretais esporádicos apresentam esta característica genética. Assim sendo, vimos que os estudos de biologia molecular tem contribuído para demonstrar que o ciclo de proliferação celular da mucosa intestinal é dependente da ação de um grupo de proteínas específicas e que alterações

ocorridas nos genes produtores destas proteínas exercem um papel decisivo no desenvolvimento dos tumores colorretais. Visando auxiliar na compreensão dos processos da carcinogênese a serem descritos a seguir sumarizamos na Tabela 1 as principais proteínas citadas acima e seus efeitos sobre as células da mucosa intestinal.

Uma vez conhecidas as principais proteínas envolvidas no ciclo celular, iremos abordar na próxima seção os conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal, baseados nos estudos das alterações genéticas ocorridas no epitélio intestinal.

**Tabela 1 - Proteínas relacionadas à carcinogênese colorretal.**

Proteína	Classificação	Função
APC	Supressora	Ação reguladora sobre a proliferação celular epitelial
K-ras	Oncogenese	Transmissão membrana-núcleo de ativação do crescimento e diferenciação celular a partir de estímulos extracelulares
DCC	Supressora	Auxilia na adesão celular, reduzindo o potencial metastático
p53	Supressora	Detecta falhas no DNA da célula e bloqueia a divisão celular para que ocorram o reparo da lesão ou morte celular
hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6	Proteínas de reparo	Remoção de segmentos alterados de DNA e inserção de um novo segmento contendo a seqüência certa