

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Instabilidade Genética e Cancerização

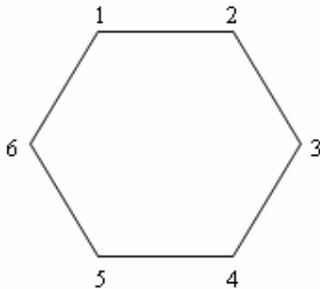
Prof. José Carlos Machado

5 Março 2007

Hoje vamos falar sobre instabilidade genética e cancerização. Há uma lógica de acumulação de erros genéticos associada ao fenómeno de iniciação e progressão neoplásica. Na 1ª metade da aula, vamos recapitular alguns conceitos simples discutidos nas últimas semanas, nomeadamente nas aulas teóricas de “Iniciação e progressão neoplásica”, “Oncogenes e cancro” e “Genes supressores tumorais”. Depois vamos discutir os dois mecanismos principais de instabilidade genética, segundo uma lógica de pergunta-resposta.

1 - “O que distingue uma célula normal duma célula tumoral?”

Aplicando o esquema do hexágono:



- 1) Auto-suficiência ou independência relativamente a sinais de crescimento
- 2) Insensibilidade a sinais que param o crescimento
- 3) Capacidade de invadir e metastizar
- 4) Potencial replicativo ilimitado, ou seja, proliferação
- 5) Capacidade de gerar angiogénese
- 6) Capacidade de escapar à apoptose

2 - “Como é que estas capacidades tumorais são adquiridas?”

Através de alterações genéticas, por isso o cancro é uma doença genómica (genética). A palavra genética tem uma conotação demasiado forte com hereditariedade e isto não é verdade, às vezes o cancro é hereditário mas a maior parte das vezes não é. Mesmo quando é esporádico não deixa de ser uma doença dos genes, mas somática e não hereditária, por isso a palavra genómica faz mais sentido.

3 - “Quais são os genes-alvo das mutações?”

Genes supressores tumorais (travões) - mutações levam a perda de função;

Oncogenes (aceleradores) - mutações implicam ganho de função.

4 - “Quantos genes têm que ser mutados para se ter um cancro?”

Depende do tumor:

- one-hit tumour - tumores geneticamente simples como os tumores hematológicos.

P.e.: leucemia mielóide crónica (LMC) que aparentemente parece ter origem numa única alteração genética, neste caso numa translocação cromossómica BCR/ABL, o famoso cromossoma de Filadélfia;

⇒ **uma** só transformação genética é suficiente para conduzir à transformação neoplásica!

- two-hit tumour – como o retinoblastoma, um tumor específico que depende da inativação de um gene supressor tumoral (RB), ou seja, **duas** alterações genéticas;
- 6 a 8-hits tumour – tumores muito mais complexos como a maior parte dos carcinomas P.e.: carcinoma colo-rectal (CCR), modelo muito bem estudado, que sabemos que necessita de 6 a 8 hits.

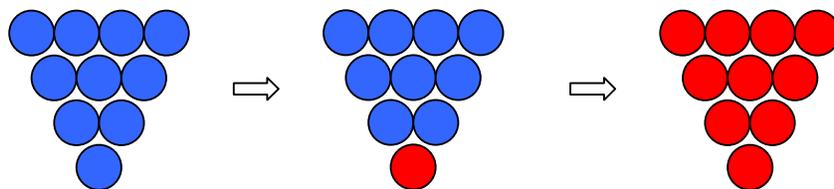
NOTA: Em relação ao mecanismo de activação, no caso de um oncogene, necessitamos de 1 mutação, enquanto que num gene supressor tumoral necessitamos de 2 mutações.

5 - “Qual a principal diferença epidemiológica entre estes últimos tumores?”

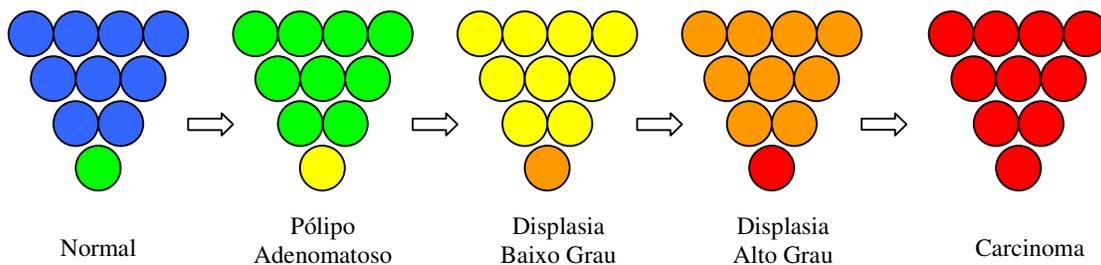
A idade média de diagnóstico é a principal diferença. O facto dos tumores serem em termos genéticos mais simples ou mais complexos vai depender da acumulação de mais ou menos alterações genéticas, que têm uma consequência directa muito evidente: a idade média de diagnóstico.

- a LMC apresenta uma curva de incidência, em termos de faixa etária, antecipada relativamente à curva de CCR. O tumor precisa de menos alterações genéticas portanto manifesta-se mais rapidamente. Dito por outras palavras:

LMC – a partir da população de células normais, **um** só evento genético dá imediatamente aquela população de células vermelhas que representa o nosso produto final: o cancro.

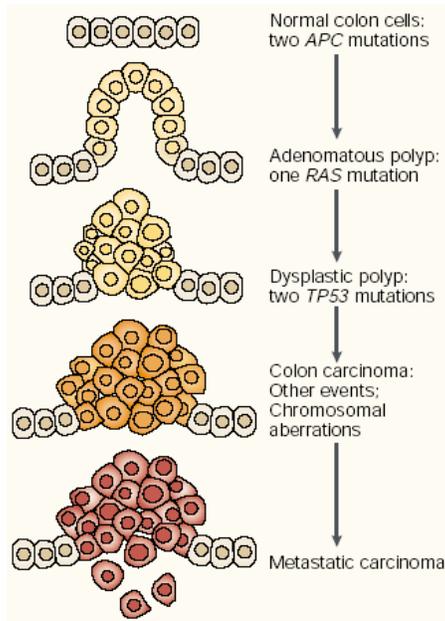


CCR – temos uma série de acontecimentos numa lógica que denominamos de expansão clonal, ou seja, numa população de células normais, há uma célula que acumula uma alteração genética e forma uma subpopulação. Dentro desta subpopulação, há uma 2ª alteração genética que gera um novo conjunto de células e por aí fora... até que finalmente, temos a nossa população de células tumorais.



Legenda: Azul – normal; Verde – pólipo adenomatoso; Amarelo – displasia de baixo grau; Laranja – displasia de alto grau; Vermelho – tumor/carcinoma.

Agora um esquema com genes:



- duas alterações do APC que colocam mucosa em risco (discutidas no seminário de CCR no âmbito da PAF – polipose adenomatosa familiar

- e do HNPCC – hereditary nonpolyposis colorectal cancer);

- mutação do oncogene RAS, que explica o aparecimento de um pólio displásico;

- p53

- aberrações/alterações cromossômicas, ou seja, **instabilidade genética.**

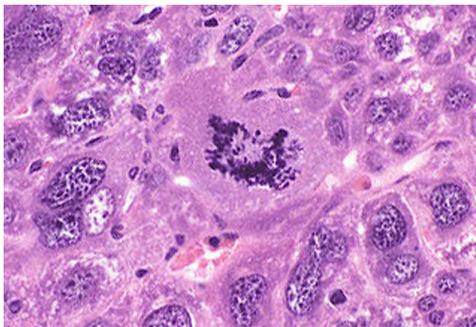
Neste modelo, há uma discussão: tendo em conta apenas a taxa de mutação típica das nossas células, não é fácil de explicar como é que, num período de 40-50 anos, uma linhagem celular acumula todas estas alterações genéticas. Assim, há algo que faz com que as alterações genéticas, à medida que se acumulam, tornem mais provável a ocorrência das alterações genéticas seguintes.

6 - “O que pode ser necessário para algumas linhagens celulares acumularem mutações suficientes para originar um cancro em tempo útil?” (Tempo útil significa tempo de vida dos humanos)

A instabilidade genética (ou taxa de mutação aumentada), um factor fundamental para explicar a rapidez com que algumas linhagens celulares acumulam 6 ou 7 alterações genéticas, em tempo útil.

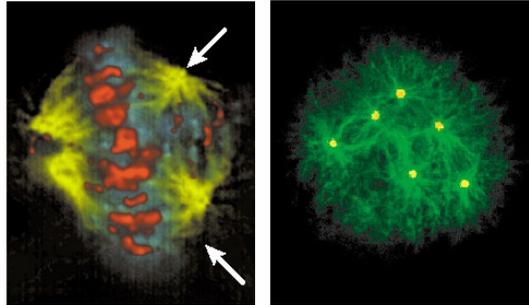
Temos fundamentalmente 2 tipos de instabilidade: cromossômica e de microssatélites.

Instabilidade cromossômica



(imagem aulas práticas – carcinoma hepatocelular com aberrações mitóticas mto evidentes) Temos células em mitose com cromossomas desorganizados, não alinhados numa placa metafásica nem a migrar para um dos pólos de forma muito evidente. Aqui temos uma aneuploidia. Isto é uma situação de instabilidade cromossômica com mitose aneuploide.

A instabilidade cromossômica pode ser algo muito simples como no cromossoma de Filadélfia – translocação cromossômica 9-22 - que dá origem àquele gene fulcral BCR/ABL. É considerada simples pois esta alteração genética por si só dá origem a um tumor específico - LMC.



Voltamos às situações complicadas, o professor mostrou duas imagens da técnica Chromosome-painting onde é possível marcar cada um dos cromossomas com uma cor diferente e distinguir aneuploidias numéricas.:

- imagem da esquerda: alteração relativamente típica de células tumorais que é a formação de fusos mitóticos aberrantes com amplificação centrossômica: a vermelho os “cinetocoros”, a verde o DNA e a amarelo os centrossomas. O fuso mitótico é tetrapolar, tendo 4 centrossomas (normalmente deveria ter 2). Daqui vão resultar células altamente anormais;

- imagem da direita: aqui temos outra aberração: na mesma célula encontramos 6 centrossomas (a amarelo), o que origina mitoses e divisões celulares onde os cromossomas se dividem de forma assimétrica que resultam em aneuploidias.

7 – “Qual a origem destas aneuploidias? O que está por trás destas mitoses e divisões celulares aberrantes?”

Não há uma resposta final para esta questão, o mais provável é estar relacionado com deficiências nos check-points mitóticos. O p53 é um gene fundamental nestes check-points, mais especificamente no check-point de passagem entre G1 e S, permitindo a progressão no ciclo celular caso esteja tudo bem em termos de integridade de DNA. Havendo erros no DNA, a proteína p53 pára o ciclo celular, podendo, inclusivamente, forçar a célula a activar a apoptose quando esta é incapaz de os reparar.

Existe também o check-point do fuso mitótico, que regula a passagem ou saída das células da fase M, ou seja, este só permite à célula progredir no ciclo celular se todos os cromossomas estiverem devidamente alinhados na placa metafásica e ligados correctamente ao fuso mitótico. Enquanto isto não acontecer, a célula não entra em anafase.

Há um complexo de genes denominado APC - Anaphase Promoting Complex (e não o gene APC do cólon!), que regula a progressão das células para a anafase. Enquanto os cromossomas não estão correctamente alinhados, este complexo está inactivo e não permite a progressão das células. Assim que estes se alinham e ligam ao fuso mitótico, o complexo é activado e as células progredem no ciclo celular, havendo separação e migração das cromátides pelo fuso. Se algum destes genes começar a funcionar mal, observam-se mitoses anormais.

Resumindo:

- normal – alinhar dos cromossomas na metáfase, activação do complexo APC e posterior separação das cromátides;

- mutações em proteínas reguladoras:

1. um dos alelos de uma proteína reguladora do APC está mutado levando à produção de quantidade anormal da proteína. Numa linha celular em que isto se verifique, é perdida a capacidade de regulação e as células entram em anafase antes do tempo podendo haver perda de cromossomas;

2. perda de uma proteína que era suposto facilitar a entrada da célula em anafase. Ainda que esteja tudo correcto, a célula não entra em anafase e temos uma mitose mais prolongada que pode levar à ruptura de cromossomas.

De seguida, o professor mostrou 3 filmes para demonstrar o efeito do mau funcionamento de genes deste complexo APC:

1 – Mitose normal

2 – Célula tumoral em que foi inactivado o gene de uma das proteínas que regula a entrada na anafase – célula tripolar com formação de 3 centrossomas que sofre uma divisão totalmente aberrante, herdando um componente cromossómico anormal.

3 – Anafase precoce – cromossomas não estão alinhados no fuso mitótico por isso a célula não se consegue separar; há cromossomas soltos no citoplasma que impedem que a citocinese se complete correctamente. A célula une-se novamente o que tem uma consequência – tetraploidia – que, nas divisões celulares subsequentes, vai acabar por gerar mais erros quando os cromossomas se separam de formas aberrantes.

Portanto, isto é só para vos mostrar que quando alguns daqueles genes que funcionam como check-points da mitose não funcionam bem, as coisas correm mal em termos de divisão celular e é relativamente simples explicar como surgem todas aquelas situações de aneuploidia que depois vemos nos tumores primários.

Instabilidade de microssatélites ou STR (short tandem repeats)

8 – “O que são microssatélites?”

Sequências de DNA repetitivas.

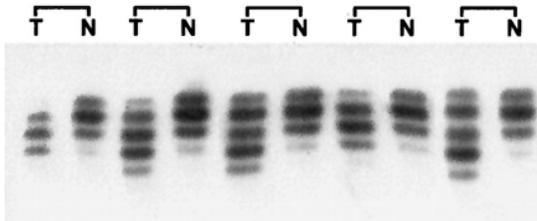
9 – “O que os caracteriza?”

São muito polimórficos. Noutros polimorfismos, como nos SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), que são substituições de um nucleotídeo, nós temos apenas 2 alelos e 3 genótipos possíveis: homozigótico para cada um dos alelos ou heterozigótico. No caso dos microssatélites, temos muitos alelos e muitas combinações genótípicas possíveis. A variedade genotípica associada a estes polimorfismos pode ser muito grande, logo a probabilidade de encontrarmos 2 indivíduos aqui na sala com o mesmo genótipo é muito menor do que se fossemos procurar indivíduos com o mesmo genótipo para um SNP.

Outra característica é a repetição de unidades básicas.

10 – “Qual é a relação entre instabilidade de microssatélites e cancro?”

Muitos cancros têm instabilidade de microssatélites. Usando o CCR como exemplo, está presente em cerca de 10 a 15% dos casos esporádicos e 95% dos casos de HNPCC, ou seja, ambos são MSI (microsatellite instability) positivos.



Quando olhamos para esta imagem electroforética (do seminário sobre cancro colorrectal esporádico e familiar) deste tipo de instabilidade, observam-se pares de DNA tumoral (T) e DNA normal (N). Do normal para o tumoral, aparecem sempre alterações, muitas vezes com aparecimento de bandas novas correspondentes à multiplicação dos alelos.

11 – “De onde surge este fenómeno de instabilidade?”

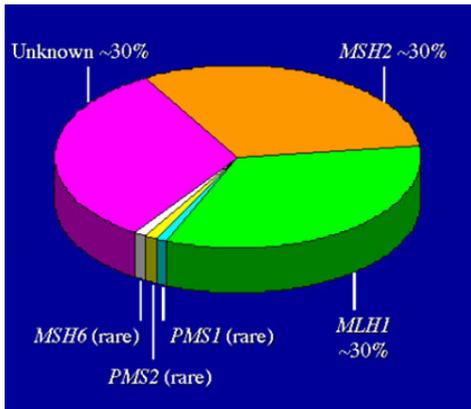
No caso do HNPCC, a função comprometida é a reparação do DNA. A célula tem vários mecanismos de reparação de DNA, um deles lida especificamente com erros de emparelhamento. Quando um nucleotídeo é mutado (p.e. uma guanina transformada em timina), um dos alelos não emparelha correctamente com o outro. Numa célula normal, isto será reparado e o DNA volta a emparelhar correctamente. Se houver um erro na reparação ou se a célula for incapaz de reparar o DNA, não há reparação e as células-filha herdaram a mutação. Esta é a origem de uma mutação. A população celular resultante daquela célula original vai partilhar esta mutação.

A instabilidade de microssatélites, no fundo, é um fenótipo de instabilidade molecular, ou seja, existe uma deficiência na célula de reparar ADN. Como ela não o consegue reparar, acumula erros ou variabilidade nos microssatélites e as células apresentam mais ou menos unidades de repetição do que o normal, manifestado em electroforese pela variação do tamanho das bandas de microssatélites.

NOTA: Alguém sugeriu mutação do gene APC como resposta, surgindo alguma confusão nesta pergunta. Assim, o professor esclareceu a dúvida, explicando que na PAF, há uma mutação do APC que interrompe a diferenciação das células, mas mantendo a sua proliferação, sem que haja instabilidade de microssatélites. Por outro lado, no HNPCC, temos deficiências em genes de reparação do DNA e, consequentemente, instabilidade de microssatélites.

Em 1994 foi publicado o 1º artigo onde foi demonstrado que o fenótipo de instabilidade de microssatélites, muitas vezes encontrado em tumores, era devido a mutações de genes envolvidos na reparação de DNA. Na altura, encontraram mutações num gene que hoje tem o nome de MLH1, que estava mutado numa certa proporção de famílias com HNPCC. Assim, muitos dos casos de HNPCC e o fenótipo de instabilidade de microssatélites, que aparece em 95% destes casos, são explicados por mutações germinais, ou seja, hereditárias, num gene de reparação de DNA.

Hoje sabe-se muito mais sobre as alterações genéticas associadas ao HNPCC.



Aqui têm um esquema onde vêem o espectro de mutações de genes de reparação de DNA associadas ao HNPCC. O MLH1 é um dos mais importantes, 30% das famílias têm mutação no MLH1, mas repararem há mutações noutros genes: o MSH2, o PMS1 e por aí fora. Todos estes genes, se repararem bem, são genes que aparecem neste esquema e fazem parte deste complexo de reparação do DNA. Portanto nos HNPCC a maior parte deles herdam mutações nestes genes.

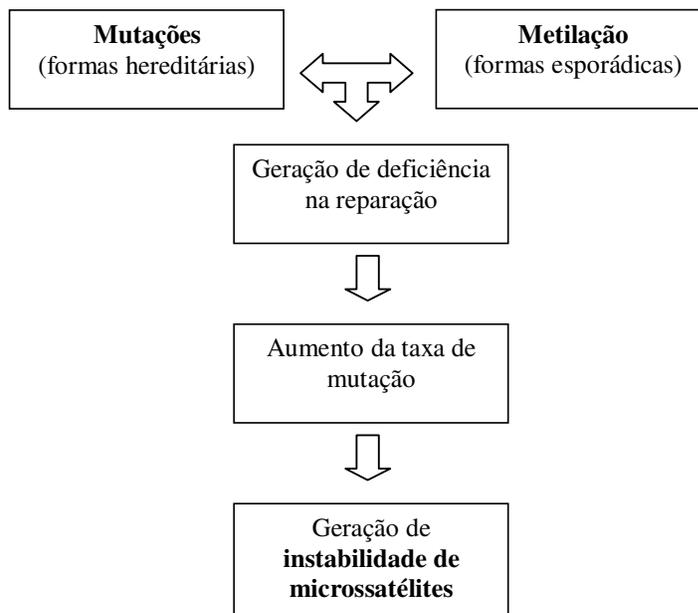
Nos CCR esporádicos não é bem assim...

12 – “O que faz a metilação e qual a sua importância?”

A metilação é um mecanismo de regulação da transcrição. Se um promotor-gene estiver hipermetilado, não transcreve porque este mecanismo impede os factores de transcrição de acederem correctamente à região promotora. Quando temos uma situação de hipometilação, o promotor está acessível e portanto há transcrição activa.

Isto é o que acontece nos CCR esporádicos com fenótipo de instabilidade. Nestes casos não há mutações dos genes como acontece nas formas hereditárias, em alternativa há hipermetilação do gene MLH1, um dos genes envolvido nas formas hereditárias.

Concluindo, dentro do CCR, temos uma versão hereditária (mutações inactivantes do gene) e uma versão esporádica (hipermetilação dos promotores). O resultado ou consequência prática é exactamente a mesma: a incapacidade da célula de reparar o DNA.



13 – “Qual a consequência deste fenómeno de metilação?”

Mais uma vez, uma deficiente reparação do DNA, causa acumulação de erros em sequências específicas e repetitivas. Uma falha neste sistema de reparação do DNA faz com que haja acumulação de erros de emparelhamento, que é isso que ele é suposto reparar.

14 – “Onde estão os microssatélites?”

Geralmente em regiões não codificantes do genoma, o que parece não ter nenhuma consequência. Mas também existem genes que têm sequências deste tipo na sua região codificante e neste caso vamos ter um envolvimento funcional, com provável inactivação destes genes.

15 – “Que tipo de mutações isto origina?”

Há vários tipos de mutação:

- missense – origina-se um diferente a.a. por troca de codão, com substituição de um nucleotídeo;
- nonsense – há substituição de um nucleotídeo com formação de um codão stop, ou seja, a proteína resultante vai ser mais curta que a normal;
- frame-shift – inserções ou deleções que alteram o padrão de leitura do DNA; os a.a. mudam a partir do local da inserção/deleção até ao codão stop, portanto o resultado prático é uma mutação nonsense, com a formação de uma proteína mais pequena que o normal.

As mutações dos microssatélites caem na categoria frame-shift, com ganho ou perda de unidades de repetição. Sendo mutações frame-shift, há inactivação de genes com formação de proteínas pequenas não funcionantes.

Nos tumores positivos para a instabilidade de microssatélites, os genes de reparação do DNA são uma espécie de facilitadores da ocorrência de mutações nos genes-alvo que são de facto os fundamentais para a transformação neoplásica. Como exemplos de genes-alvo (genes supressores tumorais) temos:

TCF4 – factor de transcrição fundamental na modulação da penetração em células do cólon;

IGF IIR – receptor de um factor de crescimento, portanto também tem a ver com a penetração;

Bax – gene regulador da apoptose;

TGF- β -RII – receptor para o factor de crescimento e inibidor do crescimento na mucosa normal do cólon; esta é uma forma das células do cólon se libertarem do efeito inibidor do TGF- β , ao mutar o receptor, este deixa de responder ao sinal de inibição por si mesmo.

FIM

Antes de mais, pedimos desculpa pelo atraso. Optamos pela desgravação integral da aula. No entanto, o professor repetiu-se bastante e limitámo-nos ao essencial, cortando as partes redundantes.

Bom estudo! 😊

Ana Sofia Oliveira
Marta Andrade
Turma 2

Glossário:

MECANISMOS/LESÕES/MEDIADORES DOS PROCESSOS DEGENERATIVOS, INFLAMATÓRIOS E NEOPLÁSICOS

Carcinogénese
Delecção
Metilação do promotor génico
Microssatélites
Mutação(ões)
Mutação somática
Mutação germinativa
Oncogénese
Reparação do ADN (excisão de nucleotídeos)
Single Nucleotide Polymorphisms(s) (SNP)
Tandem repeats (VNTR)
Translocação
Tetraploidia

GENES /PRODUTOS DE GENES/ BLOQUEADORES DE GENES/MARCADORES CELULARES E EXTRACELULARES

BCR-ABL
Bax
Genes de susceptibilidade ao cancro
Genes dos checkpoints mitóticos
Gene(s) supressor(es) tumoral(ais)
Genes que reparam o ADN
IGFII-R (Insulin-like growth factor II- Receptor)
MLH1
MSH2
Oncogene(s)
TGFβ-RII (Transforming growth factor β Receptor II)

NEOPLASIAS/LESÕES NEOPLASIFORMES/LESÕES PRECURSORAS/LESÕES PRÉ-MALIGNAS

Displasia
Leucemia mielóide crónica
Pólipo

DOENÇAS/SINDROMES

HNPCC (Hereditary non polyposis colon cancer)