

Metaplasia intestinal e cancro gástrico

Aula leccionada por: Prof. Leonor David

12/Março/2007

Esta é uma aula muito longa sobre **metaplasia intestinal**, e é fantástica! Vamos rever várias coisas vistas nos seminários sobre patologia esófago-gástrica, portanto não é uma aula que vos seja estranha. Sobretudo eu queria que vocês percebessem bem os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento deste tipo de patologia.

A metaplasia é uma lesão em que acontece alteração de um tipo de célula ou tecido adulto noutro tipo de célula ou tecido adulto.

A gente já explicou o que era uma metaplasia da mucosa gástrica onde temos **transdiferenciação** do epitélio gástrico num epitélio intestinal. Já discutiram também num seminário a transdiferenciação do epitélio esofágico pavimentoso num epitélio glandular intestinal. Existem também metaplasias noutros tecidos. Por exemplo, se vocês tiverem um traumatismo persistente de um mesênquima colageneizado, podem desenvolver uma metaplasia óssea.

Portanto há várias situações em patologia humana em que vocês têm uma modificação de um padrão de programação para outro tipo de diferenciação. O que significa que há reprogramação das células do órgão para fazerem outra coisa.

A reprogramação põe então uma questão que nós já discutimos na aula teórica sobre células estaminais: o que é que conseguimos fazer a partir de um tecido ou vários tecidos? Como sabem, isto é uma área muito importante da medicina dos vossos dias, que é a área da medicina regenerativa. O que vocês vão querer é a partir de células da medula óssea ou a partir de células do cordão umbilical, por exemplo, fazer neurónios em pessoas que têm doenças degenerativas do SNC.

Vamos ver como é que a gente estuda essas coisas, e eu acho que o que é giro nisto é vocês perceberem o que se está a fazer e como é que a gente aborda esse modelo. Portanto, o que acontece é que uma célula estaminal tecidual, a partir de uma agressão qualquer, passa a ter uma reprogramação e em vez de fazer uma célula do tecido a que pertencia passa a fazer uma célula de tipo diferente.

Também aqui há um conceito teórico de metaplasia, que é um conceito de protecção. Portanto a agressão, neste caso uma infecção por *Helicobacter pylori*, levaria à diferenciação num epitélio de tipo intestinal, e este novo epitélio seria resistente à infecção e protegeria a mucosa da persistência da infecção. Como vocês sabem, normalmente o Helicobacter não coloniza intestino, só se houver uma metaplasia gástrica. Portanto há uma grande afinidade do Helicobacter para a mucosa gástrica. Assim, a metaplasia cria uma espécie de mecanismo protector.

O que acontece é que durante uma agressão por Helicobacter, cerca de 30% das pessoas desenvolve uma metaplasia intestinal, o que deveria proteger de lesões mais graves. Contudo, isto não é bem verdade... Esta lesão não é estável do ponto de vista de diferenciação e vai ter uma probabilidade maior de cancerizar (em 7% dos casos). Esta lesão é, portanto, uma lesão precursora de cancro gástrico. Nem sempre ela funciona, como teoricamente vimos, como forma de protecção. Portanto vocês vão ter cancro em alguns dos indivíduos que desenvolvem esta lesão.

Como é óbvio, nem todos os indivíduos que desenvolvem cancro tiveram metaplasia e há indivíduos que têm metaplasia e que não desenvolvem cancro. Realmente para vocês nesta fase já não é uma coisa que vos vá surpreender! Como sabem, existe uma tendência grande para que uma neoplasia maligna seja precedida por uma neoplasia benigna: o exemplo clássico é o cancro do cólon que é muitas vezes precedido por adenomas.

A mucosa gástrica normal exprime marcadores de diferenciação muito típicos que são as **mucinas**. Elas são excelentes marcadores de diferenciação. A função principal do epitélio gástrico é a secreção de muco. Nós usamos as mucinas como alvo de identificação.

No estômago normal vocês têm a expressão de duas mucinas: a **MUC₅** e a **MUC₆**. A **MUC₅** marca a superfície das glândulas gástricas e a **MUC₆** marca a profundidade das mesmas. Sabemos que este perfil de expressão de mucinas é fundamental para a colonização por Helicobacter. Vocês vêm nesta imagem MUC₅ numa mucosa gástrica superficial; estão a ver muitas bactérias marcadas pela prata que estão ligadas às mucinas produzidas pelo epitélio superficial do estômago. Portanto vocês sabem que o Helicobacter “gosta” do muco que é produzido no estômago. Faz sentido, porque é uma bactéria que coloniza o estômago. Vocês aqui têm a morfologia típica de metaplasia: uma cripta glandular do estômago cheia de células caliciformes. Não precisam de mucinas nenhuma para dizer que é uma metaplasia intestinal, sabem que estão a ver uma morfologia diferente. E estão a ver uma morfologia que é própria do intestino, portanto estão a ver uma metaplasia intestinal.

As glândulas com metaplasia intestinal, com células caliciformes, perderam a expressão de MUC₅ e MUC₆ e ganharam a expressão de outra mucina que é uma mucina intestinal: a **MUC₂**. Já vimos que o Helicobacter liga-se às mucinas do estômago, e portanto nestas situações em que a mucosa gástrica perde a expressão de mucinas gástricas e ganha a de mucinas intestinais, a infecção não penetra no tecido metaplásico intestinal. Vocês podem ver aqui uma mucosa gástrica normal com MUC₅ cheia de bactérias; aqui numa mucosa gástrica onde há metaplasia, as bactérias não conseguem aderir.

Isto está de acordo com o conceito de defesa que tínhamos estabelecido no início. Neste caso concreto aconteceu aquilo que nós resumíamos no conceito de metaplasia: as glândulas mudaram, passaram a ter outro perfil que é o do intestino e este perfil intestinal deixou de ser compatível com a colonização da bactéria e de certa forma vem proteger a mucosa gástrica. Isto é um conceito que é verdade para esta e para muitas metaplasias, que portanto seria uma resposta eficiente após uma agressão. Se vocês tiverem um mesênquima que é induzido a sofrer uma metaplasia óssea devido a um traumatismo, de certa forma estão a proteger aquele tecido da agressão.

Além da metaplasia intestinal que acabamos de descrever, que é uma **metaplasia intestinal completa** – há perda completa do fenótipo gástrico com perda de expressão de mucinas gástricas e ganho de expressão mucinas intestinais – há outra forma de metaplasia intestinal – **metaplasia intestinal incompleta** – em que ocorre expressão simultânea de mucinas gástricas e intestinais. Este tipo de metaplasia não confere protecção eficiente. De facto se a metaplasia mantém a expressão de mucinas gástricas, a colonização pela bactéria mantém-se. Daí que a gente diga que nas situações de metaplasia intestinal incompleta haja persistência da mucinas gástricas e persistência da infecção, portanto maior risco de aparecimento de carcinoma. Portanto entre doentes com metaplasia completa e com metaplasia incompleta, aqueles que têm maior probabilidade de ter uma neoplasia são os que têm uma metaplasia incompleta.

Prof. Sobrinho Simões:

O que vocês têm que perceber é que sempre que temos um processo inflamatório crónico temos destruição, isto é, há mais destruição do que proliferação, portanto há atrofia. Isto é verdade no colo do útero, é verdade na bexiga, é verdade no esófago, é verdade no estômago, no cólon... Portanto o que é extraordinário é o aparecimento da metaplasia intestinal, o aparecimento da

gastrite crónica atrofica, e foi extraordinário perceber que aquele bicho (Helicobacter) se aguentava naquele pH. Mas a partir daí sempre que a gente tem uma inflamação crónica tem destruição, tem atrofia. Agora porque é que esta coisa depois da atrofia vem com metaplasia intestinal?

Prof. Leonor David:

O mecanismo de metaplasia é um mecanismo de protecção, é uma resposta de protecção.

Prof. Sobrinho Simões:

Por exemplo a metaplasia nos fumadores é uma metaplasia epidermóide. No esófago, a metaplasia é intestinal ou esófago de Barrett, na bexiga se vocês tiverem cistite por Schistosoma a metaplasia é epidermóide, se vocês tiverem uma “cistite hormonal” podem ter uma metaplasia glandular. Portanto isto é um processo comum no nosso organismo.

Prof. Leonor David:

É uma patologia frequente. E quase não é patologia, porque é um tecido fora do sítio...

Prof. Sobrinho Simões:

E bom! É um tecido bom ☺!

Prof. Leonor David:

Exactamente! É um tecido de protecção. Portanto a gente tem uma certa dificuldade em chamar isso de doença. Apesar de teoricamente ser um mecanismo de protecção, na prática há uma percentagem de indivíduos em que leva à morte.

Prof. Sobrinho Simões:

Se não erradicássemos o Helicobacter, daqui a 10000 anos todo o nosso estômago seria metaplásico intestinal.

Prof. Leonor David:

Adaptávamos e só tínhamos intestino!

Prof. Sobrinho Simões:

Exactamente só teríamos intestino! Como por exemplo, o que está a acontecer nas cidades com poluição. Daqui a 3000 anos os nossos filhos vão todos ter um epitélio pavimentoso em vez de epitélio colunar no revestimento brônquico. Mas, apesar de isto ser uma adaptação à agressão (poluição), eles teriam outras chatices: iriam entupir mais, ficariam secos, morreriam mais cedo.

Prof. Leonor David:

A metaplasia é uma lesão teoricamente favorável, mas temos de compreender que pode haver prejuízo da função. Neste exemplo faria falta um epitélio ciliado capaz de remover as partículas de carbono que inalamos diariamente.

Prof. Sobrinho Simões:

Vejam as novas doenças, esquecendo aquelas provocadas por vírus lentos (que são inteligentes e bloqueiam a apoptose, ao contrário dos vírus citopáticos que são “burros” e matam as nossas células, sendo actualmente agentes pouco relevantes): obesidade... Reparem que nós somos filhos daqueles que aproveitavam tudo e mais alguma coisa para comer quando havia fome. Como eles, nós comemos alarvemente, mas ao contrário deles temos uma vida sedentária e por isso engordamos como chernes! HTA... Reparem que o sal era o bem mais precioso na Idade Média (salário vem de sal!); ora nós somos filhos dos que guardavam o sal, os outros já morreram.

Com este palavrado todo suponho que o que ele quis dizer foi que os filhos (dos filhos)ⁿ dos nossos filhos vão ter problemas respiratórios (como por exemplo metaplasia pavimentosa) porque nós andamos a respirar ar poluído em ambientes nocturnos cheios de fumo ☺

Aluno:

Se erradicarmos a bactéria do estômago pode haver regressão da metaplasia?

Prof. Leonor David:

Estamos perante a problemática da reversibilidade da lesão. Na definição que vimos no início da aula dizia que a metaplasia era uma lesão reversível. Teoricamente, se ocorre uma reprogramação genética induzida pela agressão, ao pararmos a agressão teria lógica que o tecido voltasse ao normal.

O que se verifica na prática é que é muito difícil isso acontecer. Os estudos epidemiológicos que já se fizeram sugerem que a reversibilidade é muito baixa, quase inexistente.

Prof. Sobrinho Simões:

Esta questão ainda não está bem esclarecida. Nos ensaios clínicos realizados na Europa os investigadores trataram as pessoas como se fossem todas iguais, não tendo em conta que uma metaplasia com 3 ou 4 anos não é a mesma coisa que uma metaplasia com 20 anos!! A duração do processo e a fibrose que se instala, por exemplo, podem ter influência na reversibilidade. Não devemos esquecer que já houve casos, embora sejam poucos, em que a lesão reverteu.

Prof. Leonor David:

Este ponto é muito importante pois determinaria se vale ou não a pena intervir na infecção, se vale ou não a pena erradicar a bactéria para tratar a metaplasia, a qual é já uma lesão pré-neoplásica...

Vamos agora entrar noutra parte da aula...

Como é que se desenvolve todo este processo de metaplasia?

A mucosa gástrica normal expressa MUC5 e não expressa Cdx2. Este último é um factor de transcrição importantíssimo para a diferenciação intestinal. Descobriu-se que Cdx2 desempenha um papel central, iniciador, nas lesões de metaplasia intestinal.

Nesta imagem do estômago há áreas com metaplasia intestinal, com células caliciformes, nas quais existe expressão de Cdx2 em localização nuclear. Faz sentido, pois Cdx2 é um factor de transcrição, ou seja, liga-se ao promotor de certos genes e inicia a sua transcrição.

Vamos debruçar-nos sobre duas questões:

- **Como é que Cdx2 tem a capacidade de reprogramar um epitélio de tipo gástrico para um de tipo intestinal? Como é que consegue induzir esta mudança de fenótipo?**

O que está em jogo não são mutações genéticas, mas sim regulação de genes...

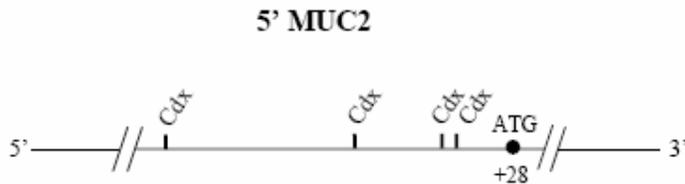
Foram feitas várias experiências para responder a esta questão.

1. Começou-se por realizar a transfecção do gene Cdx2 para células gástricas, e o que se verificou foi que essas células começaram a expressar proteínas tipicamente intestinais como MUC₂ e vilina. Mas esse resultado não significa que haja uma relação directa entre a expressão de Cdx2 e a expressão de MUC₂ pois poderia tratar-se de uma relação indirecta do género: Cdx2 → induz Proteína X, Y, Z → induzem Factores de transcrição X', Y', Z' → induzem MUC₂ e vilina.

Como saber se a relação entre a expressão de Cdx2 e de MUC₂ é directa ou indirecta?

2. O que se fez foi procurar sequências nucleotídicas do promotor do gene MUC₂ às quais se pudesse ligar Cdx2. Os factores de transcrição usam pequenas sequências de 5-6 nucleotídeos para se ligarem. E realmente foram encontradas duas sequências no promotor do gene MUC₂ às quais Cdx2 se poderia ligar!

Mas poder não significa fazer... como verificar isso?



Encontramos esta imagem num pdf relativo a esta investigação. Vê-se a zona do promotor do gene MUC₂, com 4 possíveis zonas de ligação do Cdx2. ATG indica o local onde se inicia a transcrição.

3. Numa nova experiência colocou-se cada uma das duas sequências de nucleotídeos num plasmídeo. O plasmídeo foi construído de modo a que a sequência ficasse a montante de uma região codificante de luciferase (uma proteína fluorescente).

O plasmídeo foi introduzido numa célula (a célula funcionou como um tubo de ensaio, tendo a vantagem de já conter muitas coisas que se teria de adicionar ao tubo de ensaio). A célula tem os seus próprios factores de transcrição, por isso há alguma transcrição e tradução basal de luciferase, com a respectiva fluorescência basal.

Depois introduziu-se Cdx2 na célula. Se houvesse aumento do sinal fluorescente, significaria que a relação entre a expressão de Cdx2 e MUC₂ seria directa, causal: o promotor do gene MUC₂ seria directamente transactivado pelo factor de transcrição Cdx2.

Aluno:

Porque é que existe fluorescência basal quando ainda não se introduziu Cdx2 na célula?

Prof. Leonor David:

Porque os genes são transcritos por complexos de proteínas e há sempre algumas proteínas que provocam alguma transactivação dos genes. O que estou a querer dizer, indirectamente, é que quase todas as vossas células exprimem quase todos os vossos genes, só que em níveis tão baixinhos que não têm nenhuma operacionalidade funcional. Se calhar aquela célula não tinha Cdx2 mas tem um mapa de transcrição muito raquítico que transcreve um bocadinho, mas é tão pouquinho que só se vê com a fluorescência.

Portanto eu introduzi aqui uma complicação que não é uma complicação deste caso especial, é uma complicação generalizada a muitos promotores de genes.

Continuando...se eu vir um aumento da fluorescência isso quer dizer que o Cdx2 em grande quantidade induziu um aumento enorme de transcrição no meu promotor. Dá para perceber? Muito bem!

Prof. Sobrinho Simões:

E foi isso que aconteceu... Reparem que assim se prova a tal ligação causal, o mecanismo que a professora queria provar. Continua a ser discutível que dentro de nós haja concentrações de Cdx2 como aquelas que se lá meteram. Depois é o salto da experimentação para a vida real...

Prof. Leonor David:

Agora vou fazer a mesma experiência mas depois de fazer uma mutação nos dois sítios que achei que eram sítios fundamentais, isto é, os sítios que eu achei que tinham sequências de nucleotídeos próximas das que estão descritas como sendo potencialmente relacionadas com o Cdx2.

Vou fazer um plasmídeo parecido com o anterior e vou ver o que acontece a esse plasmídeo depois de ter introduzido lá o Cdx2. Aquilo que se verifica, se for verdade que estes dois sítios são os sítios cruciais para a ligação do Cdx2, é que depois de pôr dentro da célula o vector a exprimir o cdx2 não vai haver a expressão do sinal de fluorescência. Portanto, o Cdx2 que eu vou introduzir naquele sistema celular não pode aumentar a transcrição basal de Cdx2. Isto quer dizer, que são aqueles dois sítios em que nós introduzimos mutações são de facto os sítios cruciais para se fazer a transactivação do gene MUC₂!

Assim, a gente conseguiu demonstrar que há uma relação causal entre a expressão de Cdx2 e a transactivação de um gene que é próprio do intestino, MUC₂. O Cdx2, por si só, é suficiente para induzir numa célula gástrica um fenótipo intestinal.

Prof. Sobrinho Simões:

Os ratinhos *knock in* para Cdx2 têm intestino até à boca. Estamos aqui a discutir a causa, a razão pela qual isto acontece, pois já sabíamos que isto acontecia.

Prof. Leonor David:

- **Como é que se inicia a expressão de Cdx2?**

Não é por nenhuma mutação no Cdx2. Pensa-se sim que algumas proteínas do *Helicobacter* seriam responsáveis por activar o Cdx2!

A Raquel Almeida começou por estudar a existência de doenças humanas em que há apagamento do Cdx2, como por exemplo, nas poliposes do cólon. Nesses pólipos há descrição de mutações de proteínas que são a BMP₄ e a SMAD₄.

Não vos vou chatear nada com isto, só quero mostrar o seguinte: há uma via de sinalização que leva à activação de uma proteína que se chama SMAD 4 (factor de transcrição para vários genes) e que é activada por proteínas da matriz extracelular chamadas BMPs.

O que é interessante nesta via?

Sabemos que quando esta via está alterada no cólon, os ratinhos têm estômago no lugar do intestino. Portanto a Raquel pôs a hipótese ao contrário: quem sabe se o que está activado são as BMPs, que vão activar SMAD4, que vai activar Cdx2?

As BMPs são produzidas no contexto de um processo inflamatório. Quando temos uma infecção por *Helicobacter pylori*, temos sempre gastrite crónica a ela associada e o processo inflamatório leva ao aparecimento de células que produzem BMPs. Também é giro saber que há inflamações que não são provocadas por *H. pylori*, mas sim por doenças autoimunes, que também dão metaplasia intestinal.

A Raquel Almeida pegou numa linha celular e tratou-a com BMP₂ e BMP₄ e verificou que a linha celular começou a produzir RNA mensageiro aumentado de Cdx2. Houve também aumento do nível de proteína Cdx2. Pretendia-se agora saber se isto era através da SMAD4, se seria aquela via toda que estava activada.

Vou-vos mostrar uma experiência exactamente igual àquela que vos mostrei para o MUC₂: pegamos no promotor do Cdx2, fazemos uma mutação nos sítios de ligação para a SMAD4 e vemos que quando se faz a transactivação do gene Cdx2 pela SMAD4 há uma alteração. Portanto o que a Raquel Almeida demonstrou neste estudo foi que o Cdx2 era transactivado por esta via.

Agora o que estamos a tentar perceber é como é que, num contexto de inflamação, o aumento das BMPs e da SMAD 4 transactiva o Cdx2.

Aluna:

Como é que alguém se lembrou de estudar o Cdx2?

Prof. Leonor David:

Foi um grupo de americanos. Através de estudos embriológicos em animais sabia-se que a formação do intestino dependia de genes do tipo homeobox (em biologia, os estudos que permitem identificar um gene envolvido na diferenciação embriológica são, geralmente, estudos de varrimento; normalmente faz-se o varrimento dos vários genes desde o estado embrionário até aos últimos estádios de diferenciação). Este grupo de americanos identificou Cdx2 como o gene que se exprimia no intestino das galinhas e que era fundamental para o desenvolvimento do mesmo. Portanto, eliminaram o gene Cdx2 do intestino para ver se se formava estômago, e foi o que aconteceu.

Aluno:

Há mais alguns genes alterados na metaplasia intestinal?

Prof. Leonor David:

Há muitos genes cuja expressão está alterada e que podem dar metaplasia... por exemplo o gene da metionina??

Prof. Sobrinho Simões:

O que eu tenho para dizer é muito engraçado: porque é que há tão poucos genes que façam isto? Você perguntou e muito bem! Deve haver mais... Há, mas muito poucos, porque nós estamos a trabalhar com genes mais no sentido da regulação. São genes essenciais porque são aqueles que têm a ver com a formação do nosso corpo (como é que se faz o intestino, como é que se faz o estômago, etc). Imaginem que para se fazer determinado órgão tínhamos dezenas de genes... Estávamos lixados, nunca conseguíamos, íamos ter um estômago todo ao contrário um coração todo torto. Os genes essenciais para a morfogénese têm de ser genes reguladores fundamentais, têm de ser genes cruciais. Ponham bem na vossa cabeça que estes genes da morfogénese são genes fundamentais.

Prof. Leonor David:

O Cdx2 é um gene homeobox que regula muitos outros genes. Tinha que ser um desses genes para dar uma alteração tão completa no tecido.

Aluno:

O gene Cdx2 está relacionado com a metaplasia intestinal completa ou incompleta?

Prof. Leonor David:

Está relacionada com ambas. Nós temos Cdx2 expresso na metaplasia intestinal completa e na metaplasia intestinal incompleta. O que queremos muito estudar, mas ainda não tivemos oportunidade, é o seguinte: o que é que acontece para que a partir do momento em que temos expressão Cdx2 haja dois tipos de metaplasia? Temos de perceber o que é diferente numa metaplasia intestinal completa e incompleta. Estamos muito interessados nisso!!

Podem ver o artigo publicado sobre este tema em <http://www.jbc.org/cgi/content/full/278/51/51549>

Esta aula foi desgravada por Telma Santos, Vânia Teixeira e Yolanda Martins; Turma 10.