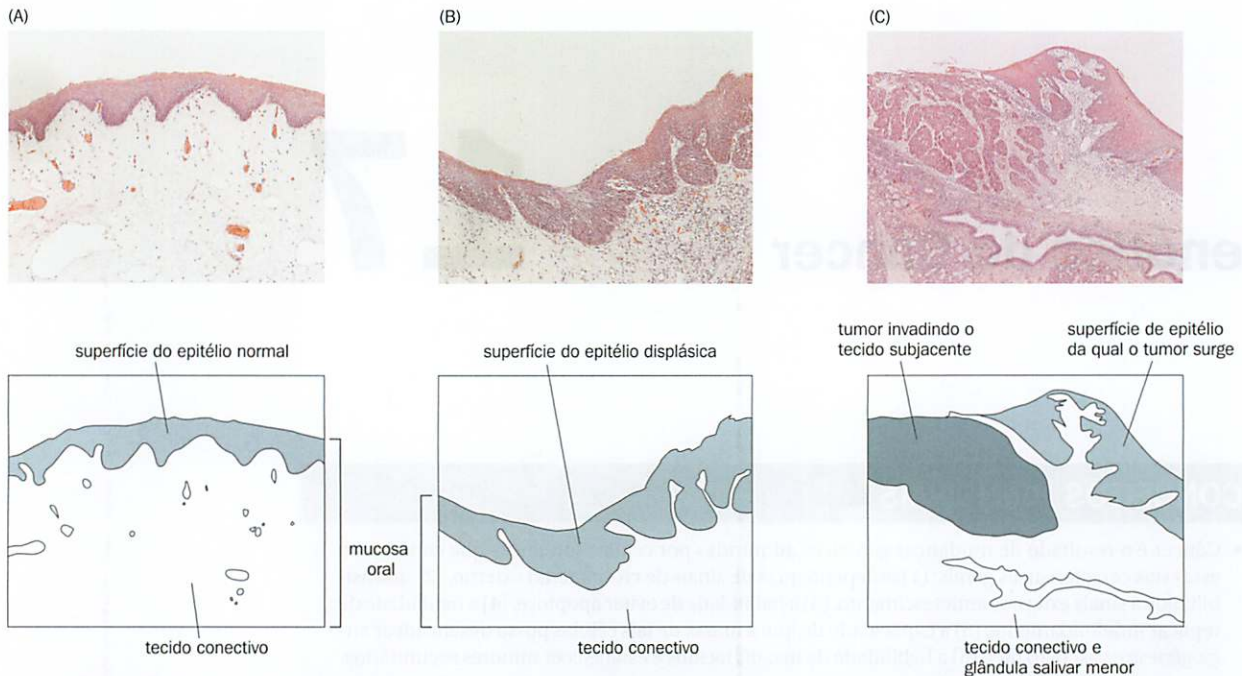


## CONCEITOS PRINCIPAIS

- Câncer é o resultado de mudanças genéticas adquiridas por células somáticas que conferem a estas seis características gerais: (1) independência de sinais de crescimento externo, (2) insensibilidade a sinais externos anticrescimento, (3) a habilidade de evitar apoptose, (4) a habilidade de replicar indefinidamente, (5) a capacidade de que a massa de tais células possa desencadear angiogênese e vascularizar e (6) a habilidade de invadir tecidos e estabelecer tumores secundários.
- Estas características são adquiridas por meio de um processo darwiniano normal de seleção natural agindo sobre mutações randômicas. A microevolução ocorre em vários estágios, com mudanças sucessivas conferindo uma vantagem seletiva extra aos descendentes de uma célula.
- Mecanismos de defesa sofisticados e altamente evoluídos protegem o corpo contra a proliferação de tais células mutantes, mas células tumorais possuem mutações que desabilitam estas defesas.
- Células-tronco, ao contrário de células somáticas, apresentam a habilidade de se replicarem indefinidamente, sendo esta uma das características das células de câncer. Assim, células-tronco são prováveis candidatos na evolução para células tumorais.
- Oncogenes normalmente agem para promover a divisão celular, mas uma rede regulatória complexa limita sua atividade. Em células tumorais, uma cópia de um oncogene é normalmente ativada anormalmente – por meio de mutações de ponto, amplificação de número de cópias ou rearranjos cromossômicos – de modo que este escape da regulação.
- Rearranjos cromossômicos em células tumorais frequentemente criam novos oncogenes quiméricos, mas podem, alternativamente, regular para cima a expressão de um oncogene colocando-o sob a influência de um poderoso reforçador.
- O papel normal de um gene supressor tumoral é limitar a divisão celular. Em células tumorais, ambas as cópias de um gene supressor tumoral são geralmente desativadas por deleções, mutações de ponto ou metilação do promotor.
- Muitos genes supressores tumorais foram identificados por meio da investigação de síndromes de predisposição ao câncer familiar. Nestas síndromes, indivíduos herdam uma mutação que inativa um alelo de um gene supressor tumoral.
- Oncogenes e genes supressores tumorais normalmente funcionam na sinalização celular que controla o ciclo celular ou em resposta a um dano no DNA. A compreensão destes processos é central ao entendimento do que pode dar errado no câncer.
- A instabilidade genômica é uma característica normal de células tumorais. Devido a sua instabilidade, tumores contêm grandes populações de células portando uma grande variedade de mutações, sobre as quais a seleção natural pode agir. Mutações condutoras contribuem para o desenvolvimento do tumor e são sujeitas a seleção positiva; mutações passageiras são subprodutos do acaso da instabilidade genômica da maioria das células tumorais.
- A maior parte da instabilidade é vista no nível cromossômico. Entretanto, alguns tumores são citogeneticamente normais, mas apresentam um alto nível de erros de replicação do DNA.
- Novas tecnologias de sequenciamento permitiram a catalogação da totalidade das mudanças genéticas adquiridas em células tumorais. Os resultados destes estudos enfatizam a individualidade e o grande número de tais mudanças em células tumorais.
- Os perfis histológico e molecular de um tumor podem fornecer informação para o prognóstico e um guia para o tratamento. Medicamentos podem marcar mudanças genéticas adquiridas específicas. Para isto, estudos genômicos utilizando arranjos de expressão são uma importante ferramenta.
- A tumorigênese é melhor compreendida ao se pensar em termos de vias alteradas mais do que em genes individuais mutados.



**Figura 17.1** Estágios no desenvolvimento de um carcinoma. Três seções histológicas da mucosa oral, coradas com hematoxilina e eosina, mostrando estágios no desenvolvimento do câncer oral. (A) Epitélio normal. (B) Epitélio displásico, o qual é uma mudança potencialmente pré-maligna. O epitélio apresenta crescimento e maturação desordenados, células anormais e um aumento na taxa mitótica (a proporção de células sofrendo mitose). (C) Câncer surgindo da superfície do epitélio e invadindo o tecido conectivo subjacente. As ilhas do tumor (carcinoma) apresentam diferenciação desordenada, células anormais e mitose atípica e aumentada. Patologistas utilizam tais mudanças na arquitetura do tecido para identificar e classificar tumores. (Cortesia de Nalin Thakker, University of Manchester.)

Câncer – uma condição na qual células se dividem sem controle – não é bem uma doença, mas o estado natural final de qualquer organismo multicelular. As pessoas estão familiarizadas com a ideia darwiniana básica de que uma população de organismos que apresenta variação hereditária na capacidade reprodutiva irá evoluir por seleção natural. Genótipos que se reproduzem mais rápido ou mais extensivamente tornar-se-ão dominantes após gerações, apenas para ser suplantados, por sua vez, por reprodutores ainda mais eficientes. O mesmo se aplica exatamente à população de células que constituem um organismo multicelular. O fator determinante pode ser um aumento na taxa de nascimento ou uma diminuição na taxa de morte. Morte e nascimento celular estão sob controle genético, e, se mutações somáticas criam uma variante que se prolifera mais rápido, o clone mutante tenderá a assumir o organismo. Cânceres são o resultado de uma série de mutações somáticas com, em alguns casos, uma predisposição herdada associada. Assim, o câncer pode ser visto como um processo evolucionário natural.

Tumores podem ser classificados de acordo com o tecido de origem: assim, carcinomas são derivados de células epiteliais, sarcomas de ossos ou tecido conectivo e leucemias e linfomas precursores de células sanguíneas. Tumores sólidos podem ser considerados órgãos, na medida em que consistem em uma variedade de tipos celulares, e pensa-se que são mantidos por uma pequena população de células-tronco (tumoriais). Uma importante distinção é entre tumores benignos (não invasivos) e malignos (invasivos). Os patologistas classificam tumores baseados na histologia vista ao microscópio (**Figura 17.1**). Testes genéticos para rearranjos cromossômicos específicos ou perfis de expressão genômica (discutidos posteriormente neste capítulo) permitem um refinamento posterior da classificação. Estas classificações são importantes para decidir o prognóstico e o tratamento, mas não explicam como o câncer evoluiu. O objetivo da genética do câncer é compreender a via mutacional seletiva de múltiplos passos que permitiu que uma célula somática normal (mas talvez uma célula-tronco) encontrasse uma população de células cancerosas proliferativas e invasivas. Enquanto os eventos moleculares-chave são revelados, novos indicadores prognósticos tornam-se disponíveis ao patologista. Espera-se que alguns destes eventos também apresentem novos alvos terapêuticos ao oncologista.

O detalhe na genética do câncer pode ser determinante. Todo o tumor é individual. Há muitos genes diferentes que adquirem mutações em um ou outro tumor, e eles inte-

ragem em vias tão complexas que é fácil se perder em um mar de detalhes. Entretanto, uma revisão importante e altamente recomendada de Hanahan e Weinberg indica que qualquer câncer invasivo provavelmente depende de células que tenham adquirido seis capacitações básicas:

- Independência de sinais de crescimentos externos
- Insensibilidade a sinais de anticrescimento externos
- Habilidade em evitar apoptose
- Habilidade de replicar indefinidamente
- Habilidade de uma massa de tais células desencadear angiogênese e se vascularizar
- Habilidade para invadir tecidos e estabelecer tumores secundários

Neste capítulo, o foco será dado para a maneira como uma célula pode adquirir essas capacidades, mais do que na catalogação de genes e mutações. Concentrando-se nestes princípios, como atualmente compreendidos, mais do que em detalhes individuais, espera-se que um esquema de compreensão possa ser estabelecido.

## 17.1 A EVOLUÇÃO DO CÂNCER

Como descrito, células estão sob forte pressão seletiva para evoluírem para células tumorais. Entretanto, embora tumores obtenham muito sucesso como órgãos, como organismos eles são falhas sem esperança. Eles não deixam prole além da vida de seu hospedeiro. No nível do organismo completo, existe, portanto, seleção poderosa para mecanismos que previnem pessoas de morrerem de tumores, ao menos até terem e educarem seus filhos. Assim, as pessoas são governadas por dois conjuntos de forças seletivas opostas. Contudo, a seleção para tumorigênese ocorre em curto prazo, enquanto a seleção para resistência ocorre em longo prazo. A microevolução de uma célula somática normal para um tumor maligno ocorre dentro da vida de um indivíduo e tem que começar de novo com cada novo indivíduo. Todavia, um organismo com um bom mecanismo antitumoral transmite-o para sua prole, enquanto ele continua a evoluir. Um bilhão de anos de evolução tem nos dotado de um sofisticado mecanismo interligado e sobreposto para proteger-nos contra tumores, ao menos durante nossa vida reprodutiva. Células tumorais potenciais são tanto reparadas e colocadas na linha como capazes de se matarem (*apoptose*). Uma mutação única não pode contornar estas defesas e converter uma célula normal em uma maligna. Há 50 anos, estudos de idade-dependente de câncer sugeriram que em média seis ou sete mutações sucessivas são necessárias para converter uma célula epitelial normal em um carcinoma invasivo. Em outras palavras, apenas se seis ou sete defesas independentes são desabilitadas por mutações pode ocorrer a conversão de uma célula normal em um tumor maligno.

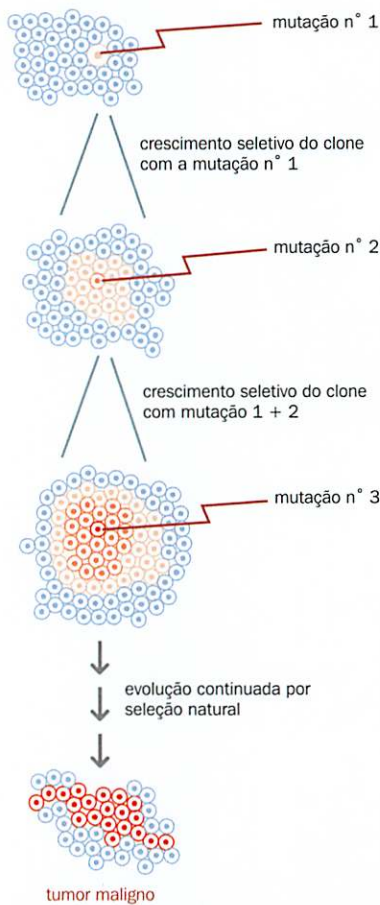
A probabilidade de que uma única célula sofra seis mutações independentes é negligenciável, sugerindo que o câncer deveria ser extremamente raro. Entretanto, existem dois

### QUADRO 17.1 Duas maneiras de tornar uma série de sucessivas mutações mais prováveis

Transformar uma célula epitelial normal em uma célula cancerosa invasiva talvez requeira seis mutações específicas em uma única célula. Pode parecer extremamente improvável que qualquer célula individual possa sofrer tantas mutações (a razão pela qual a maioria das pessoas está viva). Se uma taxa de mutação típica é  $10^{-7}$  por gene por geração celular, a probabilidade disto acontecer em qualquer uma das  $10^{13}$  células de uma pessoa é  $10^{13} \times 10^{-42}$ , ou 1 em  $10^{29}$ . Entretanto, o câncer ocorre devido a uma combinação de dois mecanismos:

- Algumas mutações potencializam a proliferação celular, criando uma população-alvo expandida de células para a próxima mutação (**Figura 17.2**). Isto pode requerer uma combinação de duas ou mais mutações.
- Algumas mutações afetam a estabilidade do genoma inteiro, tanto no nível de DNA como no nível cromossômico, aumentando a taxa de geral de mutações. Células tumorais malignas normalmente anunciam sua instabilidade genômica por seus cariótipos anormais.

Como os cânceres dependem desses dois mecanismos, eles se desenvolvem em estágios, começando com hiperplasia tecidual ou crescimentos benignos. Dentro de um estágio, mutações randômicas sucessivas geram uma população celular diversa crescente até que finalmente, por acaso, uma célula adquire uma mudança ou uma combinação de mudanças que a confere uma vantagem no crescimento.



**Figura 17.2** Evolução multiestágio do câncer. Cada mutação sucessiva confere à célula uma vantagem de crescimento, de modo que esta forma um clone expandido, apresentando assim um alvo maior para a próxima mutação.

mecanismos gerais que podem permitir que a progressão aconteça (**Quadro 17.1**). Uma mutação inicial aumenta a probabilidade de uma célula adquirir mutações subsequentes, tanto conferindo uma vantagem de crescimento (**Figura 17.2**) como induzindo instabilidade genômica. O acúmulo de todas estas mutações, entretanto, leva tempo, tanto que o câncer é principalmente uma doença da vida pós-reprodutiva, quando há pouca pressão seletiva para melhorar as defesas ainda mais.

Tipos celulares diferem na medida em que suas capacidades normais se aproximam dessas capacidades tumorais celulares – por exemplo, alguns tipos celulares se dividem rapidamente, alguns são relativamente resistentes a apoptose e assim por diante. A existência de populações de divisão rápida e células relativamente indiferenciadas em fetos e crianças explica cânceres especiais vistos em crianças jovens. Pensa-se que células-tronco são importantes como progenitores tumorais, porque elas já possuem a capacidade para proliferação indefinida. Há controvérsia do quanto células precursoras tumorais surgem de células-tronco mutadas, mas há uma concordância que células precursoras tumorais apresentam propriedades similares a de células-tronco, se estas são inatas ou adquiridas por mutação.

Os genes-alvos dessas mutações podem ser divididos em duas categorias amplas, embora, como sempre em biologia, essas sejam mais ferramentas para pensar sobre câncer do que classificações exclusivas inequívocas.

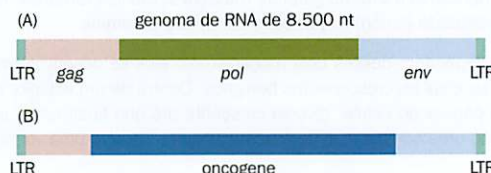
- **Oncogenes** são genes cuja atividade normal promove proliferação celular. Mutações de ganho de função em células tumorais criam formas que são excessiva ou inapropriadamente ativas. Um único alelo mutante pode afetar o comportamento de uma célula. As versões não mutadas são apropriadamente chamadas de **proto-oncogenes**.
- **Genes supressores tumorais** são genes cujos produtos agem para limitar a proliferação celular normal. Versões mutantes em células cancerígenas perderam sua função. Alguns produtos de genes supressores tumorais previnem a progressão do ciclo celular inapropriado, alguns guiam células desviantes para apoptose e outros mantêm o genoma estável e a taxa de mutação baixa garantindo a replicação precisa, o reparo e a segregação do DNA das células. Ambos os alelos de um gene supressor tumoral precisam ser inativados para alterar o comportamento de uma célula.

Por analogia com um ônibus, pode-se imaginar os oncogenes como o acelerador e os genes supressores tumorais como o freio. Comprimindo o acelerador (um ganho dominante de função de um oncogene) ou falhando todos os freios (uma perda recessiva de função de um gene supressor tumoral) deixará o ônibus fora de controle. Tradicionalmente, ambas as categorias são vistas como genes codificadores de proteínas, mas raciocínio similar poderia ser aplicado a outros elementos de controle genético – microRNAs em particular (ver Capítulo 9, p. 283).

## 17.2 ONCOGENES

Oncogenes foram descobertos em 1960, quando se pensava que alguns cânceres animais (especialmente leucemias e linfomas) eram causados por vírus. Alguns dos vírus apresentam genomas de DNA relativamente complicados (vírus SV40 e o vírus do papiloma, por exemplo), mas outros eram **retrovírus** transformantes agudos que têm genomas de RNA muito simples. O genoma de um retrovírus padrão apresenta apenas três unidades de transcrição: *gag*, que codifica proteínas internas; *pol*, a qual codifica uma transcriptase reversa e outras proteínas; e *env*, que codifica proteínas do envelope. O processamento pós-transcricional produz várias proteínas de transcritos únicos. Uma grande excitação seguiu-se quando foi descoberta que a habilidade de retrovírus transformantes agudos em *transformar* células em cultura (ou seja, mudar seu padrão de crescimento semelhante ao de células tumorais) era devida inteiramente a posse de um gene extra, o oncogene (**Figura 17.3**). Por um curto período, alguns entusiastas acredi-

**Figura 17.3** Um retrovírus transformante agudo. (A) O genoma de um retrovírus padrão apresenta três unidades de transcrição: *gag*, codificando proteínas internas; *pol*, a qual codifica proteínas necessárias para a replicação; e *env*, que codifica as proteínas necessárias para o empacotamento de novas partículas virais. Há também sequências repetidas terminais longas (LTR, do inglês *long terminal repeats*). (B) Em um erro de processamento randômico, parte do genoma retroviral normal foi substituído por um oncogene celular. O vírus não é mais competente para replicar, mas pode conduzir o oncogene para dentro da célula. nt, nucleotídeo.



taram que o câncer inteiro poderia ser explicado pela infecção com vírus que portavam oncogenes e que, uma vez que estes fossem identificados, vacinas anticâncer poderiam ser desenvolvidas.

Pesquisadores logo descobriram que os oncogenes virais eram cópias de genes celulares normais, proto-oncogenes, que foram acidentalmente incorporados nas partículas retrovirais. As versões virais eram, de alguma forma, ativadas, capacitando-as em transformar células infectadas.

A maioria dos cânceres humanos não depende de vírus, todavia seus proto-oncogenes residentes se tornaram ativados. No fim dos anos 1970, um ensaio foi desenvolvido para detectar oncogenes celulares ativados. Células de fibroblastos de camundongos, NIH 3T3 foram transfectadas com fragmentos de DNA randômicos de tumores humanos. Algumas das células eram transformadas, e o DNA humano responsável poderia ser identificado construindo uma biblioteca genômica em bacteriófagos de fragmentos de DNA das células transformadas 3T3 e então triadas por fagos recombinantes que continham a repetição *Alu* específica de humano. Os oncogenes identificados nos fragmentos transformados incluíram muitos que já eram conhecidos de estudos virais.

### Função de oncogenes na via de sinalização de crescimento

A compreensão funcional de oncogenes começa com a descoberta, em 1983, de que o oncogene viral *v-sis* (o sufixo *v-* denota um oncogene viral) era derivado de um gene celular normal, fator de crescimento derivado de plaquetas tipo beta (*PDGFB*, do inglês *platelet-derived growth factor B*). Superexpressão descontrolada de um fator de crescimento poderia ser uma causa óbvia de hiperproliferação celular. Os papéis de muitos oncogenes celulares têm atualmente sido elucidados. As formas em células normais são apropriadamente denominadas proto-oncogenes, mas agora é comum ignorar essas distinções e utilizar simplesmente o termo oncogenes para os genes normais. As versões anormais podem ser descritas como oncogenes ativados (Tabela 17.1). Felizmente, eles acabam por

**TABELA 17.1** Oncogenes virais e celulares

Função	Proto-oncogene celular	Localização	Oncogene viral <sup>a</sup>	Doença viral
<b>Fatores de crescimento secretados</b>				
Fator de crescimento derivado de plaquetas	<i>PDGFB</i>	22q13.1	<i>v-sis</i>	Sarcoma de símio
<b>Receptores de superfície celular</b>				
Receptor do fator de crescimento epidérmico	<i>EGFR</i>	7p11.2	<i>v-erbB</i>	Eritroleucemia de galinhas
Fator estimulador de colônia de macrófagos	<i>CSF1R</i>	5q32	<i>v-fms</i>	Sarcoma felino de McDonough
<b>Componentes de transdução de sinal</b>				
Receptor de tirosina cinase	<i>HRAS</i>	11p15.5	<i>v-ras</i>	Sarcoma de rato de Harvey
Proteína tirosina cinase	<i>ABL1</i>	9q34.1	<i>v-abl</i>	Leucemia de camundongo de Abelson
<b>Proteínas de ligação ao DNA</b>				
Fator de transcrição AP-1	<i>JUN</i>	1p32.1	<i>v-jun</i>	Sarcoma de aves 17
Fator de transcrição de ligação ao DNA	<i>MYC</i>	8q24.21	<i>v-myc</i>	Mielocitomatose de aves
Fator de transcrição de ligação ao DNA	<i>FOS</i>	14q24.3	<i>v-fos</i>	Osteosarcoma de camundongos
<b>Reguladores do ciclo celular</b>				
Ciclínas do tipo D				
Ciclina D1	<i>CCND1</i>	11q13	ciclina-K do herpes-vírus	Sarcoma de Kaposi <sup>b</sup>
Ciclina D2	<i>CCND2</i>	12p13	associado ao sarcoma de	
Ciclina D3	<i>CCND3</i>	6p21	Kaposi <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>Os genes virais são designados *v-sis*, *v-myc*, etc., seus correspondentes celulares podem ser descritos como *c-sis*, *c-myc*, etc. <sup>b</sup>Herpes-vírus associado ao sarcoma de Kaposi codifica uma ciclina do tipo D específica de vírus, a qual é um gene independente, não uma versão ativada de um dos genes da ciclina D humana. Entretanto, versões oncogênicas ativadas de todas três ciclínas humanas do tipo D, resultado de mutações somáticas, foram identificadas em certas leucemias.

**TABELA 17.2** Quatro formas de ativação de (proto)-oncogenes

Mecanismo de ativação	Oncogene	Tumor
Amplificação	<i>ERBB2</i> ( <i>HER2</i> )	mama, ovário, gástrico, pulmão de células não pequenas, câncer de colo
	<i>MYCN</i>	neuroblastoma
Mutação de ponto	<i>HRAS</i>	bexiga, pulmão, câncer de colo, melanoma
	<i>KIT</i>	tumores estromais gastrintestinais, mastocitose
Rearranjo cromossômico criando um novo gene quimérico	<i>BCR-ABL1</i>	leucemia mieloide crônica (ver também Tabela 17.3)
Translocação para uma região de cromatina transcricionalmente ativa	<i>MYC</i>	translocação para o <i>locus</i> da cadeia pesada da imunoglobulina por t(8;14) em linfoma de Burkitt

controlar exatamente os tipos de funções celulares as quais poderiam ser preditas como perturbadas no câncer. Cinco classes amplas podem ser distintas:

- Fatores de crescimento secretados (p. ex., *SIS*)
- Receptores de superfície celular (p. ex., *ERBB* e *FMS*)
- Componentes do sistema de transdução de sinal intracelular (p. ex., a família *RAS* e *ABL1*)
- Proteínas nucleares de ligação ao DNA, incluindo fatores de transcrição (p. ex., *MYC* e *JUN*)
- Componentes da rede de ciclinas, cinases dependentes de ciclinas e seus ativadores e inibidores que governam o progresso por meio do ciclo celular (p. ex., *CCND1* e *MDM2*)

Se oncogenes são definidos como genes que podem portar mutações de ativação dominante em tumores, várias centenas são atualmente conhecidas. O *Sanger Cancer Gene Census* fornece uma lista completa.

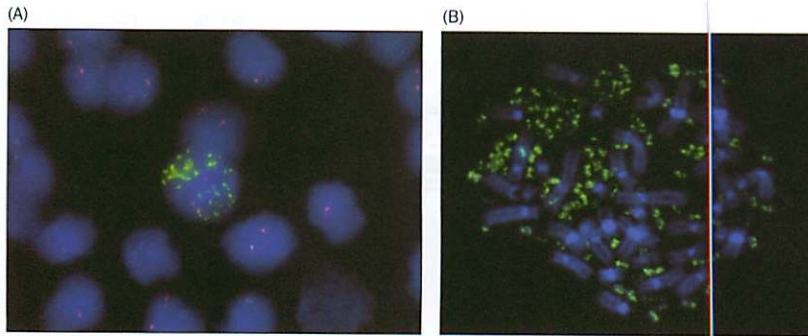
### A ativação de oncogenes envolve um ganho de função

Algumas das melhores ilustrações de patologia molecular em ação são montadas por meio das várias vias nas quais (proto) oncogenes tornam-se ativados (Tabela 17.2). A ativação envolve um ganho de função. Este pode ser quantitativo (um aumento na geração de um produto inalterado) ou qualitativo (a geração de um produto sutilmente modificado resultado de uma mutação ou um novo produto de um gene quimérico criado por um rearranjo cromossômico). Estas mudanças são dominantes e normalmente afetam apenas um único alelo do gene.

#### Ativação por amplificação

Muitas células cancerígenas contêm múltiplas cópias de um oncogene estruturalmente normal. Cânceres de mama frequentemente amplificam *ERBB2* (= *HER2*) e algumas vezes *MYC*; um gene relacionado, *MYCN*, é normalmente amplificado em neuroblastomas de estágio tardio e rabdomyosarcomas. Centenas de cópias extras podem estar presentes. Elas podem existir como pequenos corpos de cromatina pareados separados dos cromossomos (*double minutes*) ou como inserções dentro dos cromossomos normais (*regiões coradas homogeneamente*). Os eventos genéticos que as produzem podem ser muito complexos, pois geralmente contêm sequências derivadas de vários cromossomos diferentes. Amplificações gênicas similares foram vistas em células expostas a fortes regimes seletivos artificiais – genes amplificados da dihidrofolato redutase em células selecionadas para resistência ao metotrexato, por exemplo. Em todos os casos, o resultado é um grande aumento na quantidade do produto gênico.

A amplificação de um oncogene específico em células tumorais pode ser estudada por hibridização fluorescente *in situ* (FISH, do inglês *fluorescence in situ hybridization*) (Figura 17.4) ou por coloração com o anticorpo apropriado. Alternativamente, uma busca genômica por sequências amplificadas pode ser feita utilizando *hibridização genômica comparativa* ou pela análise da intensidade de sinal em um *chip* de SNP (Capítulo 16, p. 507). As mesmas técnicas também revelam qualquer perda de material, a qual pode apontar para um gene supressor tumoral (ver a seguir).



**Figura 17.4 Amplificação do oncogene *MYCN* em células tumorais de neuroblastoma.** (A) Uma única célula de neuroblastoma entre células interfásicas normais da medula óssea de um paciente. Hibridização fluorescente *in situ* foi realizada com uma sonda de *MYCN* marcada em verde e uma sonda controle, *D2Z*, marcada em vermelho, do centrômero do cromossomo 2. Cada célula normal apresentou dois pontos vermelhos e dois verdes (algumas vezes sobrepostos, resultando em um ponto amarelo). As células do neuroblastoma são cromossomicamente anormais, com quatro cópias do cromossomo 2 (o qual carrega a cópia normal do gene *MYCN*), mas com um número muito grande de cópias extras de *MYCN* distribuídas por meio do núcleo. (B) Em uma célula de neuroblastoma em metáfase, as cópias amplificadas de *MYCN* podem ser vistas formando pequenos corpos de cromatina (*double minutes*) separados do cromossomo normal (corado em azul). (Cortesia de Peter Ambros, St Anna Kinderkrebsforschung, Vienna.)

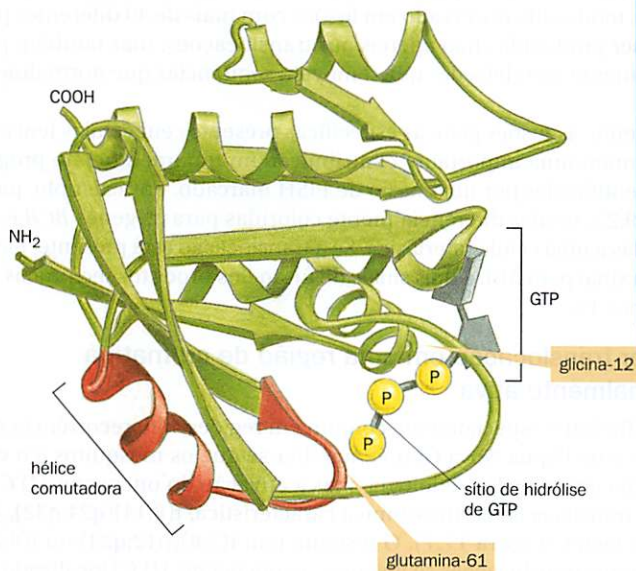
### Ativação por mutação de ponto

Os três genes da família *RAS* – *HRAS*, *KRAS* e *NRAS* – codificam proteínas pequenas que medeiam sinalização por receptor de tirosina cinase na superfície celular (ver Figura 4.15). A ligação do ligante ao receptor desencadeia a ligação de GTP a proteína Ras, e GTP-Ras transmite o sinal adiante na célula. Proteínas Ras possuem atividade de GTPase, a qual converte rapidamente GTP-Ras em GDP-Ras inativo e apaga o sinal. Mutações de ponto específicas nos genes *RAS* são encontradas frequentemente em células de uma variedade de tumores incluindo cânceres de colo, pulmão, mama e bexiga. Quase invariavelmente, estas codificam substituições de aminoácidos 12, 13 ou 61 (Figura 17.5). Todas estas possuem o efeito de diminuir a atividade de GTPase da proteína, e assim GTP-Ras é inativada mais lentamente, acarretando a uma resposta celular excessiva ao sinal do receptor.

Outro oncogene que é geralmente ativado por mutações de ponto é o *BRAF*. Este codifica uma tirosina cinase que transmite o sinal de proteínas Ras ativadas para a cinase ERK, estimulando por fim a transcrição gênica. Dois terços de melanomas malignos e um grande número de outros tumores possuem uma substituição de aminoácido no domínio cinase de *BRAF* que o ativa permanentemente. Uma única mutação, p.V599E, contribui para 80% de todas as mutações em *BRAF* em melanomas malignos. *BRAF* também é ativado algumas vezes por fusão gênica, como descrito a seguir.

### Ativação por uma translocação que cria um novo gene quimérico

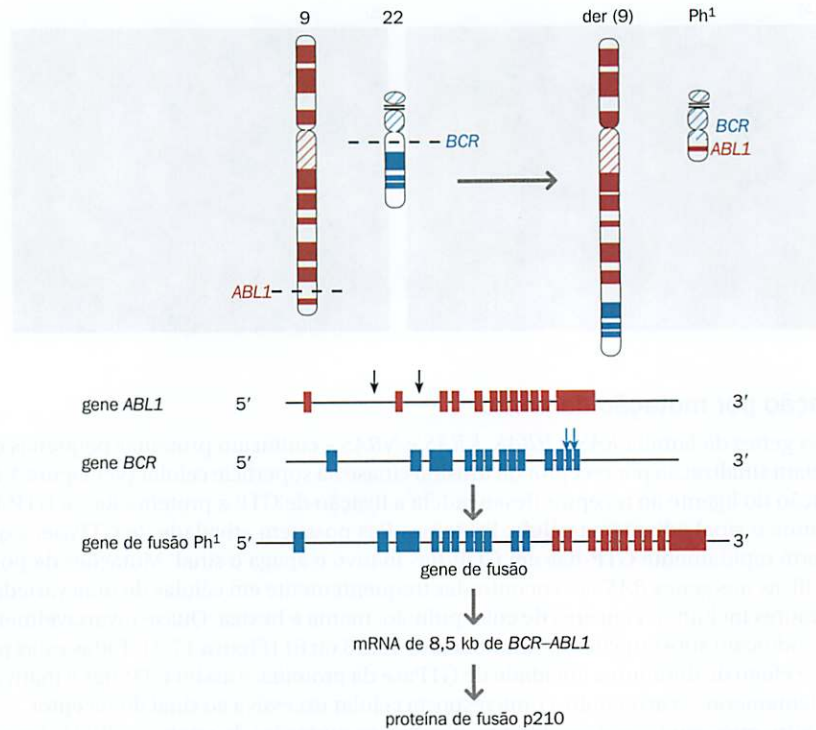
O melhor exemplo conhecido de ativação por translocação que cria um gene quimérico é o cromossomo Philadelphia ( $Ph^1$ ), um pequeno cromossomo acrocêntrico visto em 90% dos pacientes com leucemia mieloide crônica. O cromossomo  $Ph^1$  é o produto de uma translocação balanceada recíproca 9;22. O ponto de quebra no cromossomo 9 está dentro de um íntron do oncogene *ABL1*. A translocação une a parte 3' da sequência genômica *ABL1* com a parte 5' do gene *BCR* (região do grupo de pontos de quebra) no cromossomo



**Figura 17.5 Estrutura da proteína *HRAS*, na sua forma ativa ligada a GTP.** Tanto a substituição de glicina-12 como de glutamina-61 por quase qualquer outro aminoácido aborta a atividade de GTPase, resultando na ativação oncogênica do sinal de *RAS*. [De Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science/Taylor & Francis LLC.]

**Figura 17.6** Rearranjo cromossômico que ativa oncogenes.

Em leucemia mieloide crônica, uma translocação une éxons do gene *BCR* do cromossomo 22 e do gene *ABL* do cromossomo 9. Setas indicam pontos de quebra observados em diferentes pacientes. Um produto da translocação é o cromossomo Philadelphia ( $Ph^1$ ), contendo um gene de fusão quimérico *BCR-ABL*. Este codifica uma tirosina cinase, constitucionalmente ativa, que não responde aos controles normais.



22, criando um novo gene fusionado. Este gene quimérico é expresso para produzir uma tirosina cinase relacionada ao produto de *ABL1*, mas com propriedades transformantes anormais (Figura 17.6).

Muitos outros rearranjos recorrentes específicos de tumores que produzem oncogenes quiméricos são atualmente conhecidos (Tabela 17.3). Este mecanismo é visto em 15-25% das leucemias, linfomas e sarcomas, mas foram relatados em apenas 1%, ou menos, dos tumores epiteliais sólidos comuns. A escassez aparente de fusões gênicas em tumores epiteliais pode, entretanto, ser ilusória e estar relacionada a dificuldades técnicas. Uma revisão de Mitelman e colaboradores (ver Leituras adicionais) fornece uma discussão valiosa e muitos exemplos. Todos os exemplos conhecidos são catalogados na base de dados de Mitelman de aberrações cromossômicas em câncer (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/>). No momento, 358 fusões diferentes foram reconhecidas, envolvendo 337 genes diferentes. Muitos genes são promíscuos – ou seja, são encontrados fusionados com vários parceiros diferentes. O gene *MLL* em 11q23 é o exemplo mais extremo, tendo sido observado em fusões com mais de 40 diferentes parceiros. Fusões podem ser produzidas não apenas por translocações, mas também por inversões ou, ocasionalmente, por deleções que removem sequências que normalmente separam dois genes.

Clinicamente, as fusões gênicas específicas presentes em células leucêmicas do paciente apresentam uma importante contribuição no tratamento e no prognóstico. Elas podem ser identificadas por um ensaio de FISH marcado. Por exemplo, para verificar a translocação 9;22, sondas diferencialmente coloridas para os genes *BCR* e *ABL1* podem ser hibridizadas a uma célula interfásica. Se a translocação está presente, haverá um sinal para *BCR*, um sinal para *ABL* e dois sinais de fusão dos produtos recíprocos da translocação (ver Figura 2.17).

### Ativação por translocação em uma região de cromatina transcricionalmente ativa

O linfoma de Burkitt é especialmente comum em regiões com recorrência de malária na África Central e na Papua Nova Guiné. Acredita-se que os mosquitos e o vírus Epstein-Barr possuem certo papel na etiologia, mas a ativação do oncogene *MYC* é um evento central. Uma translocação cromossômica característica,  $t(8;14)(q24;q32)$ , é vista em 75 a 85% dos pacientes (Figura 17.7). O restante tem  $t(2;8)(p12;q24)$  ou  $t(8;22)(q24;q11)$ . Cada uma destas translocações se justapõe ao oncogene *MYC* (localizado normalmen-

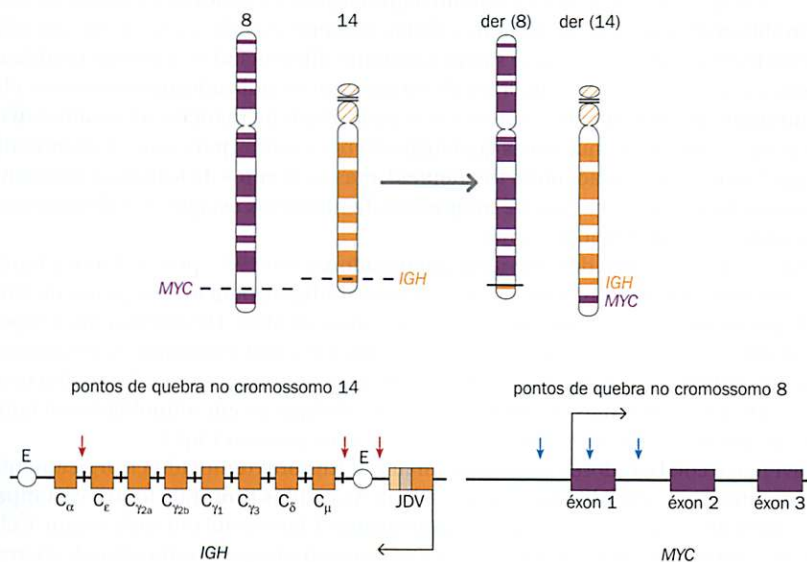


**TABELA 17.3** Exemplos de genes quiméricos produzidos por rearranjos cromossômicos específicos de câncer

Tumor	Rearranjo	Gene quimérico	Natureza do produto quimérico
LMC	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL1	tirosina cinase
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	fator de transcrição
Sarcoma de Ewing (variante)	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	fator de transcrição
Melanoma maligno de partes moles	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1	fator de transcrição
Tumor desmoplástico de células redondas pequenas	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1	fator de transcrição
Lipossarcoma	t(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP	fator de transcrição
LMA	t(16;21)(p11;q22)	FUS-ERG	fator de transcrição
Carcinoma papilar de tireoide	inv(1)(q21;q31)	<i>NTRK1-TPM3</i> (oncogene <i>TRK</i> )	tirosina cinase
LLA de pré-célula B	t(1;19)(q23;p13.3)	E2A-PBX1	fator de transcrição
LLA	t(X;11)(q13;q23)	MLL-AFX1	fator de transcrição
	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	fator de transcrição
	t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9	fator de transcrição
	t(11;19)(q23;p13)	MLL-ENL	fator de transcrição
Leucemia promielocítica aguda	t(15;17)(q22;q12)	PML-RARA	fator de transcrição + receptor do ácido retinoico
Rabdomiossarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR	fator de transcrição

Note como o mesmo gene pode estar envolvido em vários rearranjos diferentes. Para uma lista mais completa, ver <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>. LLA, leucemia linfóide aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; LMC, leucemia mieloide crônica.

te em 8q24) próximo a um *locus* de imunoglobulina (IG). Este pode ser *IGH* em 14q32, *IGK* em 2p12 ou *IGL* em 22q11. Diferentemente das translocações vistas na **Tabela 17.3**, estas não criam novos genes quiméricos. Ao contrário, elas colocam o oncogene sob a influência de elementos regulatórios que normalmente garantem alta expressão de genes de imunoglobulinas em células B produtoras de anticorpos. Na translocação 8;14, os genes *MYC* e *IGH* estão em orientações transcripcionais opostas, cabeça a cabeça. Muitas vezes, dependendo do preciso ponto de quebra, o éxon 1 do gene *MYC* (o qual é não codificante) não é incluído no material translocado. Privado de seus controles normais a montante e posicionado em um domínio de cromatina ativo, *MYC* é expresso inapropriadamente em altos níveis. Entre 25 e 65% de todas as malignizações de células B envolvem a ativação de um ou outro oncogene por um ativador de imunoglobulina, e muitas malignizações de células T envolvem uma ativação similar por um ativador em um *locus* do receptor de célula T. Previsivelmente, esses rearranjos são característicos de leucemias e linfomas, mas não de tumores sólidos.



**Figura 17.7** Rearranjos cromossômicos que ativam oncogenes. No linfoma de Burkitt, uma translocação 8;14 coloca o oncogene *MYC* perto do *locus* de *IGH* (cadeia pesada da imunoglobulina, do inglês *immunoglobulin heavy chain*) no cromossomo 14. A translocação não cria um gene quimérico, como ocorre na translocação em *BCR-ABL1* apresentada na Figura 17.6. Os dois genes estão cabeça a cabeça, em orientações transcripcionais opostas. Ao contrário, o gene *MYC* fica sob a influência de elementos regulatórios específicos de célula B associados com o *locus IGH*, tais como os ativadores, ou *enhancers*, marcados com E. Isto provoca altos níveis de expressão de *MYC* em células B. O gene *MYC* translocado geralmente carece do éxon 1 (dependendo da posição exata do ponto de quebra), mas este éxon não é codificante e sua ausência não afeta a função da proteína *MYC*.

## A ativação de oncogenes é oncogênica apenas sob certas circunstâncias

Paradoxalmente, o resultado usual da ativação de oncogenes em células cultivadas normais é a indução da parada do ciclo celular. Como um de seus muitos mecanismos de defesa, as células são capazes, de alguma maneira, de distinguir entre sinais proliferativos normais e anormais. Uma sugestão é que a estimulação oncogênica desencadeia uma resposta a dano no DNA (descrita a seguir) que encerra a proliferação celular; apenas quando a resposta a dano é defectiva, ocorre a proliferação celular em resposta a superexpressão de um oncogene. Isto realça o fato de que organismos possuem diversas linhas de defesa contra câncer, e que mutações individuais não são suficientes para causar câncer.

### 17.3 GENES SUPRESSORES TUMORAIS

A segunda principal classe de genes que são mutados em tumores é a dos genes supressores tumorais (ST). Estes são genes cuja função é manter o comportamento das células sob controle. Como descrito, isso pode implicar na restrição ou supressão inapropriada da divisão celular, mantendo a integridade do genoma ou assegurando que células atípicas incorrigíveis sejam sentenciadas à morte por apoptose. Um marco inicial na nossa compreensão de genes supressores tumorais foi o trabalho de Knudson, em 1971, sobre retinoblastoma.

#### O retinoblastoma forneceu um paradigma para a compreensão dos genes supressores tumorais

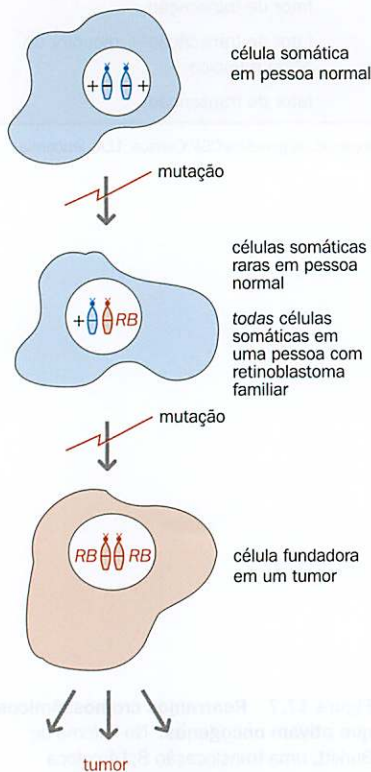
O retinoblastoma (OMIM 180200) é um agressivo câncer infantil do olho. Os tumores podem ocorrer em um ou ambos os olhos. Casos bilaterais são sempre herdáveis (o paciente é frequentemente o primeiro caso na família, mas transmite o gene para seu filho ou sua filha como um caractere dominante com penetrância incompleta). Casos unilaterais normalmente não são herdáveis. Knudson notou que a distribuição da idade de início de casos bilaterais era consistente com uma mutação única, enquanto casos unilaterais esporádicos seguiam uma cinética de dois eventos. Eles vislumbraram que todos os retinoblastomas envolviam dois eventos, mas que nos casos familiares apenas um evento era herdado (Figura 17.8).

Knudson utilizou argumentos quantitativos sofisticados para resolver seu caso; de forma simplificada, o argumento é o que se segue. Suponha que há um milhão de células-alvo e que a probabilidade de mutação é de  $10^{-5}$  por célula. O retinoblastoma esporádico requer dois eventos e afetará 1 em cada 10 mil pessoas ( $10^6 \times 10^{-5} \times 10^{-5} = 10^{-4}$ ), enquanto a forma familiar requer apenas um evento e, portanto, é altamente penetrante ( $10^6 \times 10^{-5} > 1$ ).

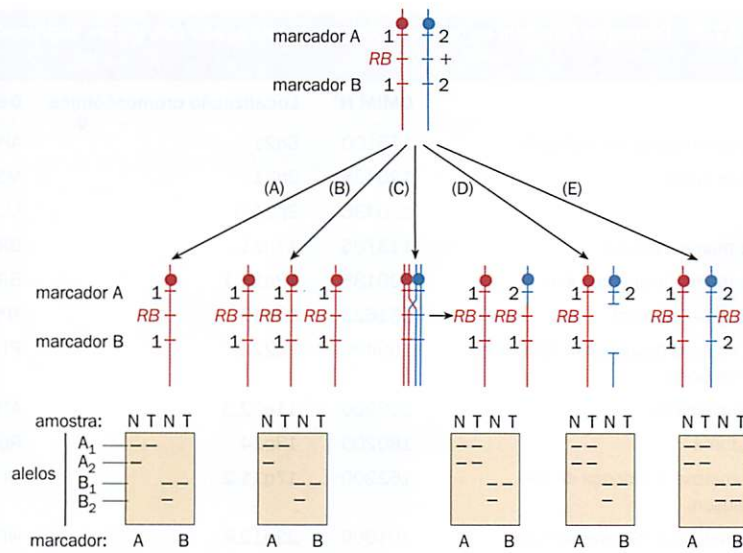
Tumores infantis provavelmente requerem menos mudanças do que carcinomas comuns de desenvolvimento mais tardios, pois se originam de células embrionárias que se dividem rapidamente e que já apresentam algumas propriedades de células cancerosas. Os retinoblastomas se desenvolvem de células progenitoras da retina. Estas são células que se dividem rapidamente e que são pobremente diferenciadas, algumas também são resistentes a apoptose. Sobre a analogia do ônibus que foi utilizada anteriormente, elas já estão dirigindo perigosamente e por isso se transformam de maneira relativamente fácil. Como sempre, múltiplas mudanças genéticas são necessárias para que o tumor maligno surja (ganhos em 6p e 1q são muito frequentes), mas os eventos de Knudson precisam ser os passos determinantes na taxa de progressão de múltiplos estágios em direção à completa manifestação do retinoblastoma.

Um importante artigo de Cavenee e colaboradores, em 1983, provou tanto a hipótese de dois eventos de Knudson como estabeleceu o paradigma para investigações de laboratório de genes supressores tumorais para os próximos 20 anos. De acordo com a hipótese de Knudson, células tumorais, tanto de casos familiares como esporádicos, deveriam carrear alguma mudança genética na localização do gene supressor tumoral hipotético, comparado com células normais do paciente. Estudos de ligação em retinoblastoma familiar sugeriram que o *locus* de suscetibilidade localiza-se na posição 13q14.

Cavenee e colaboradores estudaram material tumoral removido cirurgicamente de oito pacientes com retinoblastoma esporádico. As células tumorais foram cariotipadas para identificar o número de cópias do cromossomo 13 presente em cada tumor. Células tumorais e normais do mesmo paciente foram genotipadas para uma série de marcado-



**Figura 17.8 Hipótese de dois eventos de Knudson.** O retinoblastoma esporádico requer dois eventos (mutações) para converter uma célula normal em uma precursora tumoral. Isto exige uma improvável coincidência, assim, retinoblastoma esporádico é raro, afetando menos do que uma pessoa em 10 mil. Na forma familiar, uma mutação herdada está presente em cada célula, assim apenas um evento adicional é requerido para desencadear a tumorigênese. Dado o número de células-alvo em uma pessoa, é muito provável, mas não inevitável, que uma ou mais delas deveria sofrer tal mutação. Dessa maneira, a condição familiar tem penetrância alta, mas incompleta, e pode haver múltiplos tumores primários.



**Figura 17.9** Mecanismos de perda do alelo tipo selvagem em retinoblastoma. (A) Perda de um cromossomo inteiro por não-disjunção mitótica. (B) Perda seguida por reduplicação para originar (neste caso) três cópias do cromossomo RB. (C) Recombinação mitótica proximal para o *locus* RB, seguida por segregação de ambos os cromossomos carreadores de RB em uma célula-filha; esta foi a primeira demonstração de recombinação mitótica em humanos ou, na verdade, em mamíferos. (D) Deleção do alelo do tipo selvagem. (E) Mutação de ponto patogênica do alelo do tipo selvagem. [Adaptada de Cavenee WK, Dryja TJ, Phillips RA et al. (1983) *Nature* 305, 779-784. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.] As figuras de baixo apresentam resultados de tipagem de DNA normal (N) e de tumor (T) para os dois marcadores A e B localizados como apresentados. Note os padrões de perda de heterozigidade.

res de DNA do 13q (polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição). Como um marcador genético adicional, isoformas da proteína variável esterase D, cujo gene sabe-se que mapeia em 13q14, foram estudadas em células normais e tumorais pareadas para cada paciente. Estas comparações revelaram diversos casos nos quais o DNA constitucional (sangue) foi heterozigoto para um ou mais marcadores do 13q, mas nas células tumorais eram aparentemente homozigotos. Os pesquisadores fundamentaram que o que estavam vendo era um dos eventos de Knudson: perda de uma cópia funcional de um gene supressor tumoral. Combinando análise citogenética com estudos de marcadores de diferentes regiões do 13q, Cavenee e colaboradores foram capazes de sugerir um conjunto de mecanismos para essa perda (Figura 17.9). Estudos posteriores confirmaram esta interpretação demonstrando que, em casos herdados, o alelo selvagem foi sempre o alelo perdido nesse sentido.

Este trabalho teve duas implicações principais. Primeiro, sugeriu que cânceres esporádico e familiar poderiam compartilhar mecanismos moleculares comuns. Segundo, sugeriu duas vias de busca de genes supressores tumorais:

- O mapeamento e a clonagem posicional dos genes responsáveis por cânceres familiares
- A verificação de tumores por perdas de material cromossômico específico

A Tabela 17.4 lista alguns dos genes supressores tumorais que foram identificados por meio de estudos de cânceres familiares raros. Interessantemente, estes parecem envolver mais tumores sólidos do que leucemias ou linfomas. Talvez o requerimento para a produção massiva sustentada de células sanguíneas ao longo da vida signifique que a maioria dos genes supressores tumorais já está tendo pouco efeito de parada na proliferação dos precursores das células sanguíneas.

### Alguns genes supressores tumorais apresentam variações no paradigma de dois eventos

Retrospectivamente, o retinoblastoma é um exemplo notavelmente incomum de um mecanismo de dois eventos, talvez porque, como mencionado, células progenitoras da retina são células não usuais. Vários outros cânceres seguem similarmente o exemplo do retinoblastoma. *NF2* e *PTCH1* (ver Tabela 17.4) são exemplos nos quais um gene supressor tumoral, identificado por meio da investigação de um câncer familiar raro, acabou por ser importante no câncer esporádico correspondente – mas isto nem sempre é verdadeiro.

Alguns tipos de câncer parecem seguir diferentes caminhos microevolucionários em casos esporádicos e familiares. Por exemplo, *BRCA1* é inativado em apenas 10 a 15% dos cânceres de mama esporádicos, e aqueles tumores formam um subconjunto molecularmente identificável distinto de câncer de mama. A inativação, quando esta ocorre, não é pelos mecanismos cromossômicos vistos no retinoblastoma (ver Figura 17.9), mas por metilação do DNA (ver a seguir).

**TABELA 17.4** Cânceres familiares raros provocados por mutações nos genes supressores tumorais

Doença	OMIM N°	Localização cromossômica	Gene
Polipose adenomatosa familiar ( <i>col/i</i> )	175100	5q21	APC
Síndrome de Lynch	120435	2p21	MSH2
	120436	3p21.3	MLH1
Câncer de mama-ovariano	113705	17q21	BRCA1
Câncer de mama (início precoce)	600185	13q13.1	BRCA2
Síndrome de Li-Fraumeni	151623	17p13	TP53
Síndrome do nevo basocelular, (SNBC) ou Síndrome de Gorlin	109400	9q22.3	PTCH1
Ataxia-telangiectasia	208900	11q22.3	ATM
Retinoblastoma	180200	13q14	RB1
Neurofibromatose 1 (doença de von Recklinghausen)	162200	17q11.2	NF1
Neurofibromatose 2 (Schwannomas vestibulares)	101000	22q12.2	NF2
Melanoma familiar	600160	9p21	CDKN2A
Síndrome de von Hippel-Lindau	193300	3p25.3	VHL

Referências aos genes e às doenças podem ser encontradas no OMIM sob o número citado. Uma lista mais extensa é dada na Tabela 1 de Futreal PA et al. (2001) *Nature* 409, 850-852.

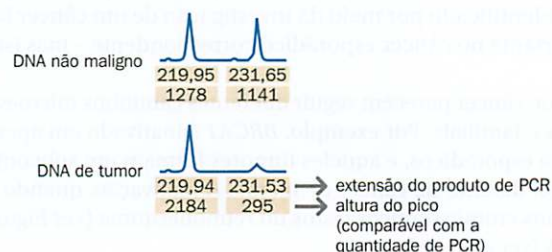
Alguns genes frequentemente perdem a função de um alelo em tumores, mas o alelo retido parece completamente funcional. Algumas vezes isto é causado pela inativação do segundo alelo por metilação, a qual não é detectada por alguns métodos experimentais utilizados, mas alguns casos parecem mesmo ser situações genuínas de um evento. Não é irracional postular que há genes supressores tumorais para os quais a haploinsuficiência é suficiente para fornecer uma vantagem no crescimento.

De maneira mais incomum, há pelo menos um caso no qual três eventos são observados. Na polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*; OMIM 175100; descrita posteriormente neste capítulo), numerosos pólipos pré-malignos (adenomas) se desenvolvem no colo. Certas mutações de linhagem germinativa herdadas são fracas e conferem um fenótipo atenuado com menos pólipos. Adenomas de tais pacientes geralmente apresentam duas mutações somáticas além da mutação herdada. Uma mutação somática inativa o alelo selvagem. Isto confere às células uma vantagem no crescimento, mas ganham uma vantagem adicional de uma deleção cromossômica que elimina o alelo *APC* parcialmente funcional da linhagem germinativa.

### A perda da heterozigiosidade foi amplamente utilizada com um marcador para localizar genes de supressão tumoral

Cavenee e colaboradores observaram o quanto mudanças genéticas somáticas em retinoblastoma provocavam **perda de heterozigiosidade (LOH)**, do inglês *loss of heterozygosity* em marcadores próximos ao *locus RB1*. Estudos em outros tipos de câncer confirmam o panorama geral, embora os mecanismos cromossômicos possam ser diferentes. Assim, por triagem de sangue pareado e amostras de tumor (normalmente tumores esporádicos) com marcadores espaçados ao longo do genoma, espera-se descobrir a localização dos genes de supressão tumoral. A **Figura 17.10** apresenta um exemplo.

**Figura 17.10** Perda de heterozigiosidade em um tumor. Eletroferogramas de um marcador amplificado por PCR. Traço superior: DNA de células sanguíneas do paciente é heterozigoto para o marcador (dois picos de igual tamanho). Traço inferior: DNA de tumor apresenta quase uma total perda do alelo de 231pb. A pequena quantidade remanescente é provavelmente amplificada de tecido estromal (normal) contaminante. (Cortesia de Lise Hansen, Universidade de Aarhus.)

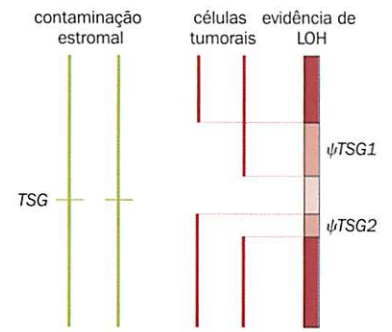


Análises da perda de heterozigidade foram as principais atividades na pesquisa de câncer durante os anos 1990, mas é justo perguntar se os resultados justificaram os esforços. Células cancerígenas avançadas podem apresentar LOH em até um quarto de todos os *loci*, então grandes amostras são necessárias para destrinchar as mudanças específicas do *background* geral. Arranjos de CGH e outras abordagens genômicas suplantaram estudos com marcadores individuais. Os resultados sugerem a presença de um considerável número de genes supressores, ainda que tentativas em continuar tais estudos por clonagem posicional tenham obtido uma taxa de sucesso bastante baixa.

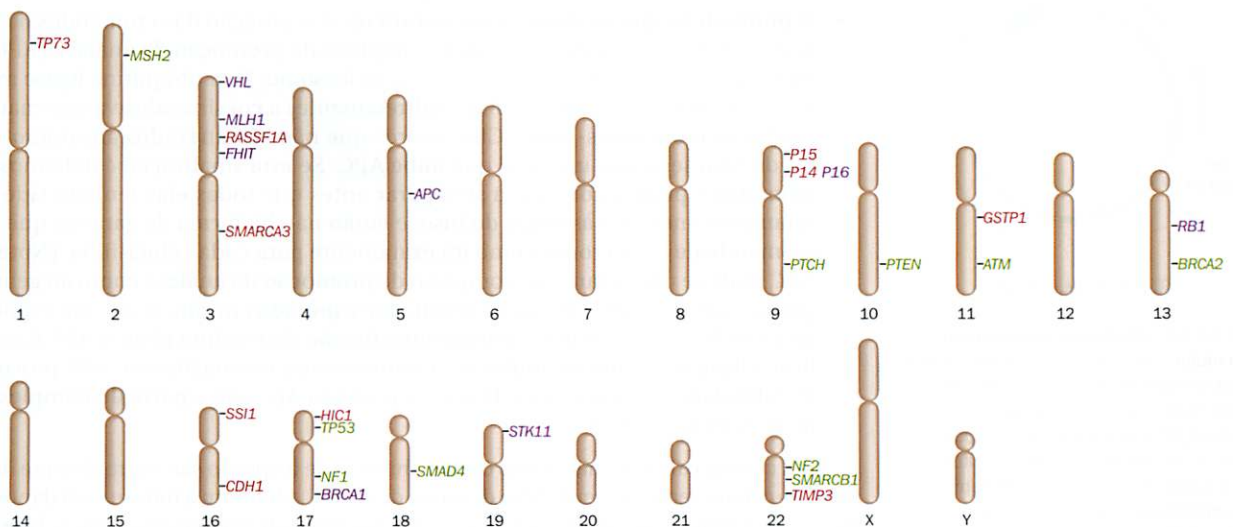
O DNA de tumor utilizado nos estudos de LOH sempre veio de uma coleção de células, e estas podem não ser geneticamente homogêneas. A **Figura 17.11** ilustra um obstáculo que surge da contaminação inevitável de material tumoral primário de células estromais (normais). É melhor falar de um desequilíbrio alélico quantitativo do que de uma perda “tudo ou nada” de heterozigidade. Linhagens celulares podem ser utilizadas para contornar o problema da heterogeneidade, mas linhagens celulares tumorais normalmente têm muito mais anormalidades cromossômicas do que células tumorais primárias. Um problema mais geral é que quase nunca há qualquer informação sobre os cariótipos dos tumores utilizados em estudos de LOH - LOH é um produto da instabilidade cromossômica e do reparo deficiente das quebras de dupla-fita do DNA que são tão características de células tumorais. Talvez algumas das perdas observadas sejam subprodutos de padrões específicos de instabilidade cromossômica mais do que a seleção para a perda de um gene supressor tumoral.

### Genes supressores tumorais são muitas vezes silenciados epigeneticamente por metilação

Genes supressores tumorais podem ser silenciados por deleção (refletida pela perda de heterozigidade) ou por mutações de ponto, mas um terceiro mecanismo muito comum é a metilação do promotor. Este mecanismo é visto em genes nos quais o promotor contém *ilhas CpG*. Nas células normais, a maioria das ilhas CpG não é metilada (ver Capítulo 11 para uma discussão sobre exceções). Em células tumorais, geralmente é observada a metilação de ilhas CpG que normalmente não são metiladas nos promotores de certos genes. O efeito é a prevenção da expressão de um gene. Genes específicos diferem-se na sua suscetibilidade deste tipo de silenciamento (**Figura 17.2**). Alguns genes supressores tumorais (p. ex., o *MSH2*) são frequentemente silenciados por mutação, mas nunca por metilação. Em outros, (p. ex., o *MLH1*), as metilações ocorrem como uma alternativa comum a mutações de ponto, enquanto em alguns (p. ex., *RASSF1A* em 3p21 e *HIC1* em 17p13.3), a metilação é o único mecanismo conhecido causador de perda de função tumor-específica.



**Figura 17.11** Um obstáculo na interpretação de dados de LOH. O verdadeiro evento neste tumor é a deleção homocigota do gene *TSG*. Na região da deleção homocigota, todo o produto da PCR é derivado do material estromal contaminante (linhas verdes), o qual é geneticamente normal. Assim, dados de LOH apresentam a retenção da heterozigidade do *locus TSG* (rosa claro). Nas regiões flangeadoras, um alelo está presente nas células tumorais, e então o produto de PCR apresenta LOH (rosa escuro). O padrão sugere a existência de dois *loci* supressores tumorais espúrios,  $\psi TSG1$  e  $\psi TSG2$ . A situação verdadeira poderia ser revelada por hibridização com fluorescência *in situ* (FISH) ou por testes imuno-histoquímicos para o produto gênico *TSG*.



**Figura 17.12** Vias de silenciamento de genes supressores tumorais. Genes apresentados em verde são silenciados apenas por mutação e aqueles em vermelho apenas por metilação, enquanto aqueles em roxo podem ser silenciados por qualquer um dos mecanismos. [De Jones PA & Baylín SB (2002) *Nat. Rev. Genet.* 3, 415-428. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.]

## 17.4 DESREGULAÇÃO DO CICLO CELULAR EM CÂNCER

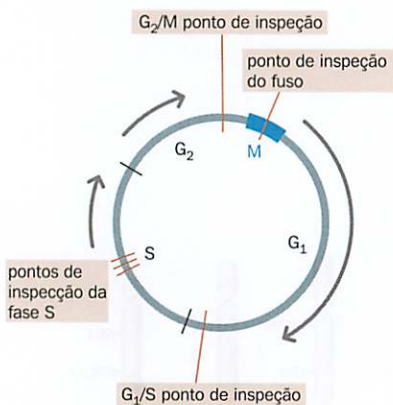
Qualquer célula tem três opções de comportamento: pode progredir ao longo do ciclo celular para completar outra rodada de divisão, pode evitar o ciclo celular e tornar-se uma célula não divisora ou pode morrer (apoptose). Algumas células também têm a opção de seguir um programa de diferenciação, como as células sanguíneas apresentadas na **Figura 4.17**. As células selecionam uma dessas opções em resposta a estímulos internos e externos. A desregulação do ciclo celular é a característica primordial de células cancerígenas. Estas células progridem implacavelmente ao longo de rodadas após rodadas de mitoses, mesmo quando seria mais apropriado pausar, sair do ciclo ou cometer suicídio por apoptose. Não surpreendentemente, os genes que geram e interpretam os sinais que controlam a progressão do ciclo celular figuram em listas de oncogenes e genes supressores tumorais.

A progressão por meio do ciclo celular é controlada por *ciclina*s e *cinases dependentes de ciclina*s e regulada em uma série de pontos de inspeção. Os fatores que controlam o processo foram descritos no Capítulo 4 e são brevemente recapitulados aqui.

A progressão é controlada por níveis flutuantes de uma série de proteínas ciclina, as quais são requeridas para a ativação de cinases dependentes de ciclina (Cdks; ver Figura 4.14B). A montante das Cdks, está um batalhão de ativadores e inibidores que agem nos complexos Cdk-ciclina. A rede completa de cinases, ciclina, inibidores e ativadores integram muitos sinais diferentes, garantindo um controle responsivo e flexível do ciclo celular. Como mencionado no Capítulo 4,  $G_1$  é a fase na qual as células gastam a maior parte do seu tempo e fazem a maior parte do seu trabalho, mesmo que estejam destinadas finalmente a prosseguir para a fase S e então por meio do ciclo. Controles na progressão por meio de  $G_1$  são alvos especialmente importantes de mutações oncogênicas. Alguns destes personagens nesses controles são descritos a seguir.

A progressão de uma fase do ciclo para outra é controlada em uma série de pontos de checagem (**Figura 17.13**). Isto garante que uma célula possa progredir para o próximo estágio do ciclo apenas quando esta, e em particular seu DNA, estiver em uma condição apropriada. Existem três principais pontos de inspeção:

- **O ponto de inspeção  $G_1/S$ .** Este ponto de inspeção é especialmente importante, pois uma célula que passa a fronteira  $G_1/S$  está comprometida a sofrer mitose. Este ponto de checagem é controlado por Cdk2/ciclina E. A entrada para a fase S é bloqueada quando há danos irreparáveis no DNA. Danos irreparáveis levam a apoptose. Dentro da fase S há pontos de inspeção adicionais nos quais danos no DNA previnem que novas origens de replicação tornem-se ativas.
- **O ponto de inspeção  $G_2/M$ .** Células são bloqueadas de adentrar na mitose a menos que a replicação e o reparo de qualquer dano ao DNA estejam completos. A entrada na mitose depende da ativação de Cdk1/ciclina B pela fosfatase Cdc25C. A replicação incompleta do DNA ou danos não reparados geram um sinal que ativa inibidores de Cdc25C, prevenindo, dessa maneira, que Cdk1 torne-se ativo.
- **O ponto de inspeção do fuso (ou mitótico).** A separação das cromátides na anáfase da mitose é desencadeada pelo complexo de promoção da anáfase (APC, do inglês *anaphase-promoting complex*) ou ciclossomo. Esta ubiquitina ligase multiproteica degrada ciclina A e B, e (indiretamente) a coesina adesiva que mantém unidas as cromátides-irmãs. Cinetócoros que não são anexados aos microtúbulos do fuso secretam um sinal que inibe APC. Se esta sinalização é defeituosa, as cromátides podem começar a se separar antes que todas elas tenham sido corretamente anexadas às fibras do fuso, e então não há forma de garantir que uma cromátide de cada cromossomo irá exatamente para cada célula-filha. (Note que APC pode se referir tanto ao complexo de promoção da anáfase como ao gene supressor tumoral *APC*, descrito a seguir, que é mutado em câncer de colo esporádico e familiar. Isto é confuso, porque uma função do produto gênico *APC* é estabilizar a ligação dos microtúbulos aos cromossomos, e mutações em *APC* provocam instabilidade cromossômica. Porém, a proteína *Apc* não é parte do complexo de promoção da anáfase).



**Figura 17.13 Pontos de inspeção do ciclo celular.** Uma série de controles previne a célula de ingressar na fase S (ponto de inspeção  $G_1/S$ ), ou em mitose (ponto de inspeção  $G_2/M$ ) com danos não reparados no DNA, ou de iniciar a anáfase da mitose até que todos os cromossomos tenham sido corretamente anexados às fibras do fuso (ponto de inspeção do fuso). Durante a fase S, danos no DNA previnem a ativação sequencial de novas origens de replicação.

Em células cancerígenas, todos os mecanismos de inspeção são normalmente defeituos. As células replicam seu DNA a despeito de danos, adentram a mitose com danos não reparados e tornam-se ineficientes na segregação correta de seus cromossomos. Tudo isso desestabiliza o genoma e prepara o terreno para a evolução futura em direção à maturação da malignização.

## Três genes supressores tumorais principais controlam os eventos na fase G<sub>1</sub>

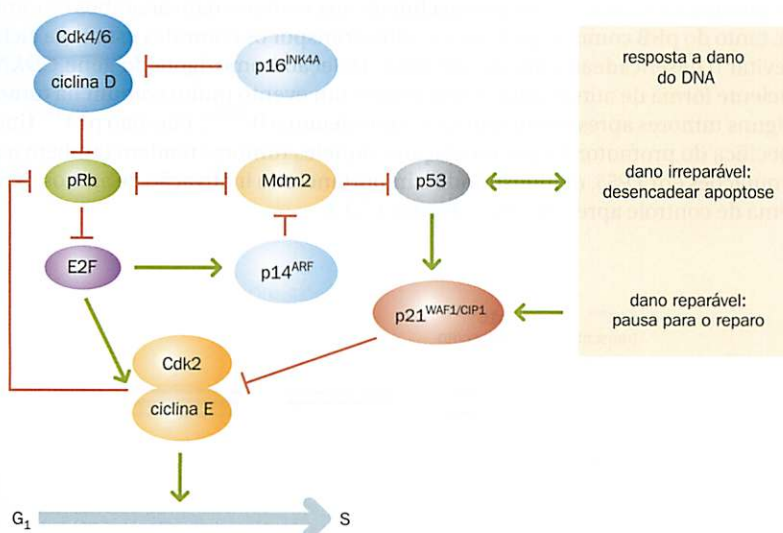
Eventos na fase G<sub>1</sub> são particularmente críticos para a carcinogênese, porque é quando as células tomam a decisão se irão ou não se dividir. Três proteínas, os produtos dos genes *RB1*, *TP53* e *CDKN2A*, apresentam papel central no controle da progressão por meio da fase G<sub>1</sub>. Mutações somáticas nestes três genes estão entre as mais comuns mudanças genéticas em células tumorais. Além disso, mutações herdadas em cada um deles são causas bem conhecidas de síndromes de câncer familiar (ver Tabela 17.4).

### pRb: um regulador-chave da progressão por meio da fase G<sub>1</sub>

O gene *RB1* foi identificado por meio do seu papel no retinoblastoma, como descrito anteriormente, mas é amplamente expresso e auxilia no controle do ciclo em todas as células. O produto gênico, pRb, é uma proteína nuclear de 110 kD. Algumas células possuem duas proteínas relacionadas, p107 e p130, concedendo alguma redundância na via de Rb. A falta dessa redundância em certas células explica provavelmente porque a perda da função de *RB1* resulta em tipos de tumores muito específicos. O pRb liga e inativa o fator de transcrição celular E2F, cuja função é requerida para a progressão do ciclo celular (Figura 17.14). Entre 2 e 4 horas antes de uma célula adentrar a fase S, complexos de ciclina D e Cdk4 ou Cdk6 fosforilam pRb. Isto o inativa, permitindo que E2F fique livre. Uma vez livre, E2F estimula a transcrição de uma variedade de genes cujos produtos são necessários para a progressão em direção a fase S, incluindo particularmente a ciclina E. Em células com mutações de perda de função em *RB1*, E2F é inapropriadamente ativado. Várias oncoproteínas virais (adenovírus E1A, antígeno SV40-T e a proteína E7 do papilomavírus humano) atingem o mesmo resultado pela ligação e sequestro ou degradação de pRb, favorecendo, dessa forma, a progressão do ciclo celular.

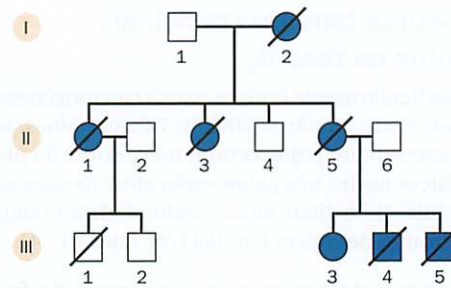
### p53: o guardião do genoma

O fator de transcrição p53, codificado pelo gene *TP53*, tem sido denominado o guardião do genoma devido ao seu papel central na prevenção da ciclagem celular inapropriada. Células tumorais com p53 ausente ou não funcional podem continuar a replicar DNA danificado e não sofrer apoptose. Normalmente, os níveis de p53 em uma célula são baixos. A proteína Mdm2 ubiquitina p53, marcando-o para a degradação. *MDM2* é um alvo transcrricional de p53, então há uma alça de retroalimentação negativa que mantém as concentrações de p53 baixas. *MDM2* é um oncogene que é amplificado em muitos sarcomas. Sinais de um conjunto de sensores de estresse celular, incluindo sensores de dano no DNA, levam à fosforilação de p53. Este fosforilado já não é um substrato para Mdm2, e assim o nível de p53 nas células se eleva. Isto aumenta a transcrição p53 dependente de genes, tais como aquele que codifica p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, um inibidor de Cdk2 e, portanto, do ciclo celular, e de genes como *PUMA*, *BAX* e *NOXA* que controlam apoptose.



**Figura 17.14** Controles sobre a progressão do ciclo celular e integridade genômica mediados pelos produtos gênicos de *RB1*, *TP53* e *CDKN2A*. Esses controles formam pelo menos parte do ponto de inspeção do ciclo celular G<sub>1</sub>/S. Os mecanismos de ativação e inibição envolvem frequentemente a fosforilação de resíduos de serina e tirosina em várias proteínas.

**Figura 17.15** Uma genealogia típica da síndrome de Li-Fraumeni. Malignizações típicas da síndrome de Li-Fraumeni incluem câncer de mama bilateral diagnosticado aos 40 anos na avó (I<sub>2</sub>). Suas filhas foram diagnosticadas com um tumor no cérebro aos 35 anos (II<sub>1</sub>), sarcoma de tecidos moles aos 19 anos (II<sub>3</sub>) e câncer de mama aos 32 anos (II<sub>5</sub>). Os filhos da filha II<sub>5</sub> foram acometidos de um osteossarcoma aos 8 anos (III<sub>3</sub>), leucemia aos 2 anos (III<sub>4</sub>) e sarcoma de tecidos moles aos 3 anos (III<sub>5</sub>). O avô (I<sub>1</sub>) foi diagnosticado com câncer de colo aos 59 anos; isto é assumido como uma coincidência e não relacionado à síndrome de Li-Fraumeni. [De Malkin D (1994) *Annu. Rev. Genet.* 28, 443-465. Com permissão de Annual Reviews.]



O p53 apresenta dois correspondentes, p63 e p73, cujas funções se sobrepõem parcialmente àquelas de p53. Entretanto, *TP53* é o principal alvo de mutações em câncer. A perda ou mutação de *TP53* é provavelmente a mudança genética mais comum em câncer. O *TP53* localiza-se em 17p13 e é uma das regiões mais comuns de perda de heterozigossidade em uma ampla variedade de tumores. Tumores que não perderam *TP53* muito frequentemente apresentam versões mutadas deste.

Para completar o panorama de *TP53* como um gene supressor tumoral, mutações constitucionais em *TP53* são encontradas em famílias com síndrome de Li-Fraumeni herdada predominantemente (OMIM 151623). Familiares afetados sofrem múltiplos tumores primários, incluindo sarcomas de tecidos moles, osteossarcomas, tumores de mama, cérebro, córtex adrenal e leucemia (Figura 17.15).

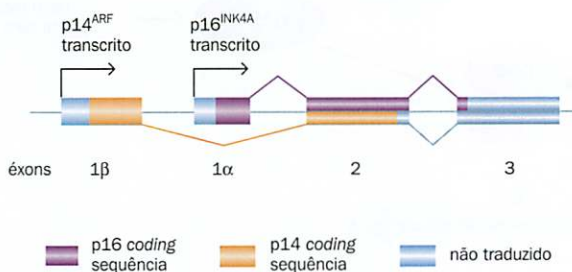
**CDKN2A: um gene que codifica duas proteínas regulatórias fundamentais**

O notável gene *CDKN2A* em 9p21 utiliza promotores alternativos e primeiros éxons para codificar duas proteínas estruturalmente não relacionadas (Figura 17.16). Éxons 1α, 2 e 3 codificam a proteína p16<sup>INK4A</sup>. Esta é inibidora de Cdk4/6, servindo então para manter pRb em seu estado ativo e desfosforilado. Em contrapartida, isto previne E2F de estimular a progressão da célula por meio de G<sub>1</sub> em direção à fronteira G<sub>1</sub>/S (ver Figura 17.14). Assim, p16 é uma proteína supressora tumoral, cuja perda de sua função acarreta incorreções no ciclo celular.

Um segundo promotor inicia a transcrição um pouco a montante, no éxon 1β. O éxon 1β é unido aos éxons 2 e 3, mas o quadro de leitura é trocado de tal forma que uma proteína inteiramente não relacionada p14<sup>ARF</sup> (ARF de quadro de leitura alternativo, do inglês *alternative reading frame*) é codificada (o homólogo em camundongos é p19<sup>ARF</sup>). A p14<sup>ARF</sup> media a parada de G<sub>1</sub> pela desestabilização de Mdm2, a oncoproteína responsável pela baixa manutenção dos níveis de p53. A perda da função de p14<sup>ARF</sup> leva a níveis excessivos de Mdm2, destruição excessiva de p53, e ainda perda de função do controle do ciclo celular.

Raras mutações herdadas de *CDKN2A*, geralmente afetando apenas p16<sup>INK4A</sup>, são vistas em algumas famílias com melanoma múltiplo, mas mutações somáticas são muito mais frequentes. Células tumorais provavelmente necessitam inativar ambos os ramos do sistema, tanto do pRB como do p53, para a célula transpor os controles usuais na ciclagem e para evitar o desencadeamento da apoptose. Deleção homocigota do gene *CDKN2A* é uma eficiente forma de atingir aquele objetivo e é um evento muito comum na tumorigênese. Alguns tumores apresentam mutações que afetam p16<sup>INK4A</sup>, mas não p14<sup>ARF</sup> (inativação específica do promotor 1α por metilação). Aqueles tumores tendem também a apresentar mutações em *TP53*, demonstrando a importância da inativação de ambos os ramos do sistema de controle apresentado na Figura 17.14.

**Figura 17.16** Os dois produtos do gene *CDKN2A*. Este gene (também conhecido como *MTS* e *INK4A*) codifica duas proteínas completamente não relacionadas. A p16<sup>INK4A</sup> é traduzida dos éxons 1α, 2 e 3, e p14<sup>ARF</sup> dos éxons 1β, 2 e 3 – mas com um quadro de leitura diferente dos éxons 2 e 3. Os dois produtos gênicos estão ativos nos braços do controle do ciclo celular pRb e p53, respectivamente, como apresentado na Figura 17.14.





## 17.5 INSTABILIDADE DO GENOMA

A instabilidade genômica é uma característica praticamente universal das células tumorais. A instabilidade pode ser de dois tipos:

- **Instabilidade cromossômica (CIN, do inglês *chromosomal instability*)** é a forma mais comum. Células tumorais normalmente apresentam cariótipos anormais, com cromossomos extras e ausentes, rearranjos, etc. Linhagens de células tumorais frequentemente apresentam instabilidade cromossômica, adquirindo novas alterações durante o cultivo.
- **Instabilidade de microssatélite (MIN, do inglês *microsatellite instability*)** é uma instabilidade no nível do DNA encontrada em certos tumores, especialmente em alguns carcinomas do colo.

A instabilidade é provavelmente necessária para permitir que a célula acumule mutações suficientes a fim de completar a microevolução de uma célula somática normal para um câncer invasivo. Alguns argumentam que a instabilidade é apenas um subproduto acidental da microevolução de um tumor e que o número de divisões celulares em populações epiteliais é suficiente para acumular o número de mutações necessárias sob taxas normais de mutação. No entanto, tumores normalmente apresentam CIN ou MIN, mas não ambos, e isto sugere que a instabilidade não é um produto do acaso, mas resultado da seleção.

### Vários métodos são utilizados para avaliar células tumorais quanto a mudanças cromossômicas

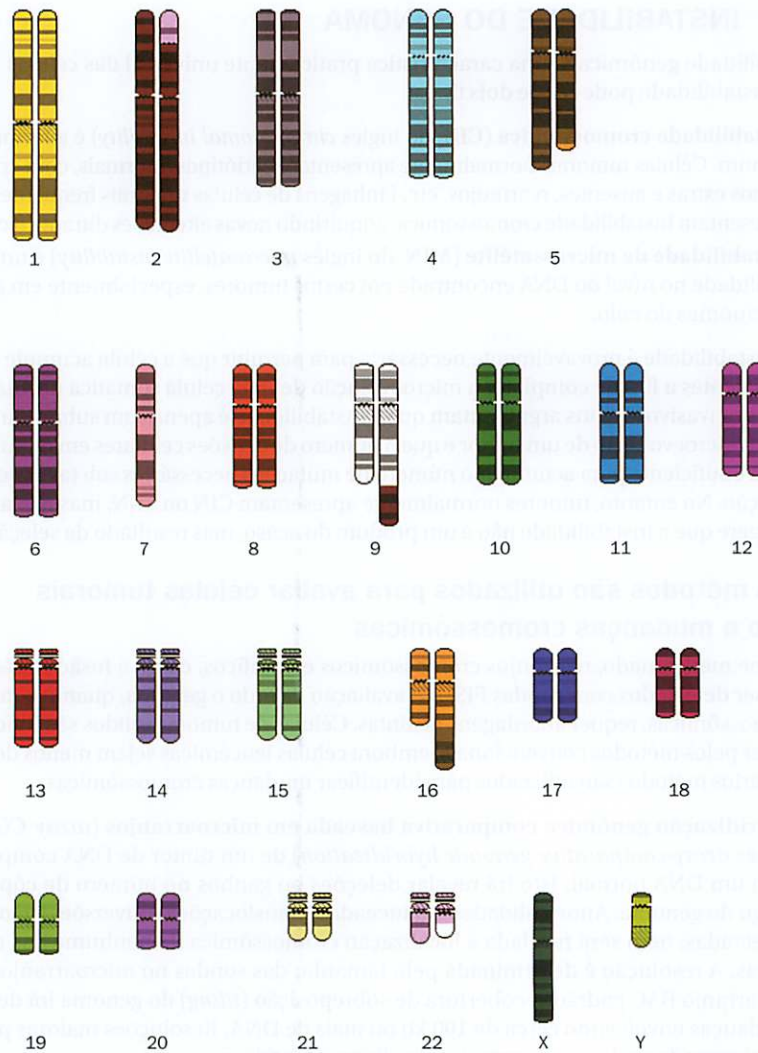
Conforme mencionado, rearranjos cromossômicos específicos, como a fusão *BCR-ABL1*, podem ser detectados com sondas FISH. A avaliação de todo o genoma, quanto a mudanças cromossômicas, requer abordagens distintas. Células de tumores sólidos são difíceis de cariotipar pelos métodos convencionais, embora células leucêmicas sejam menos desafiadoras. Vários métodos são utilizados para identificar mudanças cromossômicas:

- **Hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (*array-CGH*, do inglês *array-comparative genomic hybridization*)** de um tumor de DNA comparado com um DNA normal. Isto irá revelar deleções ou ganhos no número de cópias ao longo do genoma. Anormalidades balanceadas (translocações e inversões) não serão detectadas, nem será revelada a localização cromossômica de nenhuma das cópias extras. A resolução é determinada pelo tamanho das sondas no microarranjo. Com um arranjo BAC padrão, a cobertura de sobreposição (*tiling*) do genoma irá detectar mudanças envolvendo cerca de 100 kb ou mais de DNA. Resoluções maiores podem ser alcançadas pelo uso de arranjos de oligonucleotídeos.
- **Hibridização do DNA tumoral a um *chip* de SNP de alta resolução.** A perda da heterozigose é imediatamente aparente, e variações mais gerais no número de cópias podem ser identificadas pela intensidade reduzida ou aumentada do sinal de hibridização com sondas relevantes. Aplicam-se as mesmas limitações do *array-CGH*.
- **FISH multicolorido (cariotipagem espectral e M-FISH)** utilizando um coquetel de diversas tintas cromossômicas coloridas. Uma tinta cromossômica é uma mistura de várias sondas FISH, todas derivadas do mesmo cromossomo e todas etiquetadas com a mesma cor de fluoróforo, de modo que após a hibridização o cromossomo relevante parece estar pintado desta cor ao longo de toda a sua extensão (ver Figura 2.16). Um editor de imagem apresenta o cariótipo com as sequências de cada cromossomo original apresentada em uma cor diferente. Isto irá revelar todas as anormalidades, balanceadas ou não balanceadas, que medem pouco mais do que algumas megabases. Estes métodos apresentam a vantagem de se identificarem os cariótipos de células individuais, diferentemente dos métodos baseados em arranjos, os quais utilizam DNA extraído de várias células. A técnica foi especialmente útil para linhagens celulares, as quais normalmente possuem muitas anormalidades cromossômicas. Muitos exemplos podem ser pesquisados na página de cariotipagem espectral (SKY, do inglês *spectral karyotyping*) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/)). A Figura 17.17 apresenta um exemplo.

### Três mecanismos principais são responsáveis pela instabilidade cromossômica e pelos cariótipos anormais

As várias anormalidades cromossômicas observadas em células tumorais são normalmente aleatórias, embora forneçam material para seleção futura de variantes com crescimento mais rápido.

**Figura 17.17 Resultado do SKY para células de um paciente com leucemia mieloide aguda.** O diagrama resume o resultado do uso de tintas cromossômicas multicoloridas. Existe uma variante da translocação padrão 9;22 (envolvendo o cromossomo 2, mais uma translocação adicional 5;16 e a perda de uma cópia do cromossomo 7). O cariótipo é interpretado como 45,XY,t(2;9;22)(p21;q34;q11),t(5;16)(q31;q24),-7. [Caso número 6 de H Padilla-Nash, reproduzida com a permissão do NCBI SKY archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/>).]



Elas provavelmente surgem de três formas:

- Em muitas células tumorais, o ponto de checagem do fuso (*spindle checkpoint*) é defeituoso. As cromátides podem começar a se separar antes que todas estejam corretamente ligadas às fibras do fuso. Não existe, portanto, maneira de garantir que exatamente uma cromátide de cada cromossomo vá para cada célula-filha. Células tumorais frequentemente contêm cromossomos extras, os quais podem produzir fusos anormais. A falha do ponto de checagem do fuso é provavelmente a principal fonte das várias anormalidades numéricas vistas em células tumorais.
- Células tumorais são capazes de progredir por meio do ciclo celular a despeito de danos de DNA não reparados. Normalmente, o dano não reparado gera um sinal que trava o ciclo celular até que o dano seja reparado, enquanto danos que não podem ser reparados desencadeiam a apoptose. Em células tumorais, o sistema de sinalização de dano ou a resposta apoptótica são muitas vezes defeituosos. Anormalidades cromossômicas estruturais podem ser um subproduto de tentativas de replicação do DNA ou de mitose com DNA danificado.
- Células tumorais podem replicar até o ponto em que os telômeros tornam-se demasiadamente curtos para proteger as extremidades dos cromossomos, levando a todo o tipo de anormalidade estrutural.

### Os telômeros são essenciais para a estabilidade cromossômica

Conforme visto no Capítulo 2, as extremidades de todos os cromossomos humanos carregam uma sequência repetida (TTAGGG)<sub>n</sub>. Ela forma uma estrutura de DNA especial que liga proteínas específicas e protege as extremidades dos cromossomos para que não sejam tra-

tados pela célula como quebras duplas no DNA. O comprimento do telômero diminui entre 50 e 100 pb a cada geração celular em função da incapacidade da DNA-polimerase de utilizar a extremidade 3' da fita de DNA como molde para a replicação (ver Figura 2.13). O comprimento do telômero é restaurado por uma enzima especial contendo RNA, a telomerase, a qual está presente na linhagem germinativa humana, mas ausente nos tecidos somáticos.

Em culturas prolongadas, células normais atingem um ponto de senescência, no qual elas param de dividir. Células com certos defeitos genéticos (p. ex., fibroblastos com deficiência de p53 e pRb, ou portando oncoproteínas virais) continuam além da senescência e atingem a crise telomérica, a qual provavelmente representa o ponto no qual os telômeros são tão curtos que não podem mais proteger as extremidades dos cromossomos. A célula passa então a tratar as extremidades cromossômicas como quebras duplas no DNA, as quais ela tenta reparar por recombinação homóloga ou união de extremidades não homólogas. A junção aleatória dos cromossomos produz translocações, incluindo cromossomos com dois centrômeros (cromossomos dicêntricos). Estes podem ser tracionados em duas direções na anáfase da mitose, formando pontes. As pontes por fim se quebram, criando novas extremidades quebradas e desencadeando novas rodadas de fusão e quebra. O resultado é o caos cromossômico.

A maioria das células em crise telomérica morre, mas as cerca de 1 em  $10^7$  que sobrevivem possuem grandes anormalidades cromossômicas. Adicionalmente, elas tornaram-se imortais. De um modo ou de outro, células tumorais sempre adquirem a habilidade de se replicar indefinidamente, mantendo os seus telômeros. Entre os tumores avançados metastáticos, 85-90% recuperaram a expressão de telomerase; os remanescentes usam um mecanismo alternativo (ALT), baseado em recombinação.

## O dano ao DNA envia um sinal para a p53, a qual inicia respostas protetoras

Conforme descrito no Capítulo 13, o DNA de cada célula está constantemente sofrendo danos provocados por agentes exógenos, tais como radiação ionizante e radiação ultravioleta, assim como por processos endógenos tais como depurinação, deaminação de citosinas e ataque por espécies reativas de oxigênio. Conforme mencionado, a resposta normal de uma célula contra tais danos é travar o ciclo celular até que o dano seja reparado, desencadeando a apoptose caso o dano não possa ser reparado. Proteínas codificadas por diversos genes supressores de tumor bem conhecidos são envolvidas no sistema que detecta dano ao DNA e organiza a resposta celular. Mutações herdadas de perda de função nestes genes são associadas com elevado risco de câncer.

### ATM: a detecção primária do dano

A proteína ATM pode ser responsável pela detecção primária do dano. Esta proteína cinase, com 3.056 resíduos, é de algum modo ativada por quebras duplas no DNA – talvez por alterações na conformação da cromatina. Uma vez ativada, a ATM cinase fosforila vários substratos, incluindo as proteínas p53, NBS1 (nibrina), CHEK2, e BRCA1 (Figura 17.18). Uma cinase relacionada, ATR, realiza uma função similar em forquilhas de replicação que estão paradas, as quais são uma consequência de alguns tipos de dano ao DNA. Perda de função do gene *ATM* causa ataxia telangiectasia (AT; OMIM 208900). Homozigotos afetados apresentam uma predisposição a vários tumores, além de imunodeficiência, instabilidade cromossômica e ataxia cerebelar. Heterozigotos portadores de algumas mutações específicas no gene *ATM* apresentam risco aumentado de câncer de mama, apresentando problemas desafiadores de tratamentos médicos, uma vez que eles também são sensíveis à radiação, de modo que a mamografia de raios X pode aumentar o risco de câncer de mama.

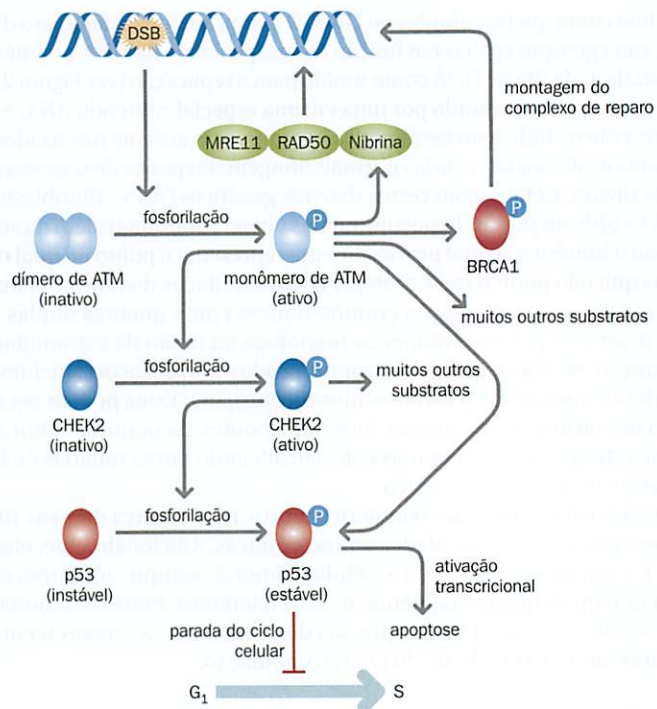
### A proteína nibrina e o complexo MRN

A proteína nibrina é fosforilada pela ATM e forma um complexo (MRN) com as proteínas MRE11 e RAD50. O complexo se posiciona em sítios de dano e pode ajudar a recrutar enzimas de reparo. A perda da nibrina causa a síndrome de Nijmegen (NBS, do inglês *Nijmegen breakage syndrome*; OMIM 251260). A NBS é clinicamente semelhante à AT, mas inclui microcefalia e retardo do crescimento, em vez de ataxia. Mutações no gene *MRE11* também resultam em um distúrbio semelhante à AT (ATLD, do inglês *AT-like disorder*; OMIM 604391).

### CHEK2: uma cinase mediadora

A proteína CHEK2 é uma cinase mediadora, ativada pela fosforilação mediada pela ATM. Ela então repassa o sinal da ATM para outros substratos, incluindo a p53. No Capítulo 16,

**Figura 17.18** Parte do mecanismo de sinalização pelo qual o dano ao DNA causa a parada do ciclo celular. A ATM cinase é ativada por quebras duplas (DSB, do inglês *double-strand breaks*) e fosforila diversos substratos, alguns dos quais são envolvidos no reparo ao DNA (p. ex., nibrina e BRCA1). A ATM também ativa a proteína CHEK2, que por sua vez ativa a p53, o principal alvo do sistema de detecção do dano ao DNA. A p53 fosforilada atua no sentido de bloquear o progresso no ciclo celular, além de promover a apoptose.



uma mutação de troca de fase no gene *CHEK2* foi mencionada como um fator herdado da suscetibilidade ao câncer de mama, fornecendo aos portadores um risco relativo de 2,34. Intrigantemente, foi demonstrado que uma variante não sinônima (*missense*), encontrada em cerca de 5% das pessoas na Europa central, *reduz* pela metade o risco de câncer de pulmão em fumantes.

### O papel do BRCA 1/2

A proteína BRCA1, produto do primeiro gene implicado no câncer de mama familiar, posiciona-se em sítios de dano ao DNA. Um complexo multiproteico formado por proteínas envolvidas na resposta e no reparo no dano ao DNA foi isolado e nomeado com a sigla BASC (do inglês, *BRCA-1 associated genome surveillance complex*). A BRCA1 também atua na recombinação, no remodelamento da cromatina e no controle da transcrição.

O gene *BRCA2* codifica outra proteína muito grande (3.416 aminoácidos), com múltiplos domínios funcionais e um papel central no câncer de mama familiar. Ela não apresenta semelhança estrutural com a proteína BRCA1, porém compartilha diversas funções. Uma das funções é carregar várias moléculas da proteína RAD51 no DNA fita simples em sítios de dano, como parte do mecanismo de reparo recombinatório. Além de ser a causa de alguns casos de câncer de mama hereditário, uma classe particular de mutações homocigotas no gene *BRCA2* causa a forma D1 da anemia de Fanconiver em OMIM 227650 e 605724). Esta é uma síndrome autossômica recessiva de anormalidades congênitas, falha progressiva da medula óssea, hipersensibilidade celular do dano ao DNA e predisposição ao câncer.

### A p53 ao resgate

A proteína p53 é o principal alvo a jusante no sistema de detecção do dano ao DNA. O dano ao DNA causa a fosforilação da p53. Conforme mencionado (ver Figura 17.14), isso estabiliza a p53, prevenindo sua marcação pela Mdm2 e sua consequente degradação. O nível aumentado de p53 leva à ativação da p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, uma proteína que inibe Cdk2 e previne o avanço para a fase S do ciclo celular. Níveis aumentados de p53 também podem levar à transcrição de genes pró-apoptóticos. Quando o sistema de sinalização está defeituoso, o ponto de checagem G<sub>1</sub>/S falha e as células podem tentar replicar DNA danificado. Isso leva à instabilidade genômica, conforme descrito. Células com defeitos nas proteínas descritas aqui parecem ser particularmente prejudiciais no reparo a quebras duplas no DNA. Pode ser que outros tipos de dano não dependam tão intensamente da detecção por este sistema para serem reparados. Mais detalhes sobre a forma pela qual o dano ao DNA leva ao atraso no ciclo celular podem ser encontrados na revisão realizada por Kastan e Bartek (ver Leituras adicionais).

## Defeitos no mecanismo de reparo envolvidos em uma variedade de distúrbios genéticos levam ao câncer

As células tumorais podem falhar na sinalização do dano ao DNA ou, alternativamente, o sinal pode estar intacto mas a célula pode ter um defeito que a torna incapaz de reparar certos tipos de dano. Qualquer célula que seja incapaz de reparar o DNA danificado deve ser eliminada por apoptose, mas em uma população inteira de tais células deve haver pressão seletiva que favoreça variantes a fim de evitar a morte. Os diferentes tipos de dano e os diferentes mecanismos de reparo foram discutidos no Capítulo 13 e são revisados por Hoeijmakers (ver Leituras adicionais). Defeitos em cada mecanismo são associados a formas específicas de câncer:

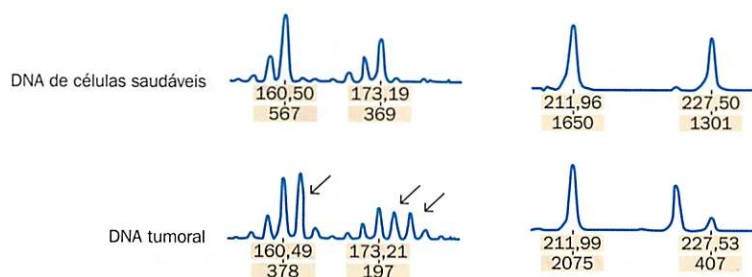
- O **reparo por excisão de nucleotídeo** é defeituoso em várias síndromes com predisposição ao câncer, especialmente nas várias formas de xeroderma pigmentoso (XP; OMIM 278700). Pacientes com XP são homocigotos para mutações herdadas de perda de função em um dos genes envolvidos no reparo por excisão de nucleotídeo. Eles são incapazes de reparar o dano ao DNA causado por radiações ultravioleta. Eles são extremamente sensíveis à luz do sol e desenvolvem vários tumores na pele exposta.
- Defeitos no **reparo por excisão de base** são incomuns em tumores humanos, mas uma pesquisa realizada por Farrington e colaboradores (ver Leituras adicionais) com pacientes com câncer de colo mostrou que defeitos raros em homocigose na enzima de reparo MUTYH estão associados com um aumento de 93 vezes no risco de câncer de colo. Além disso, estas mutações foram responsáveis por 0,5% de todos os casos de câncer de colo.
- Defeitos no **reparo de quebras duplas** afetam primariamente a recombinação homóloga em vez da união de extremidades não homólogas, embora ambos os mecanismos necessitem do sistema ATM-NBS1-BRCA1-BRCA2, mencionados anteriormente.
- Defeitos no **reparo de erro na replicação** causam um aumento generalizado nas taxas de mutação. Estes defeitos vieram à tona quando estudos de câncer de colo familiar revelaram o fenômeno da instabilidade de microsatélites, descrito a seguir.

## A instabilidade de microsatélites foi descoberta por meio da pesquisa com câncer de colo familiar

A maioria dos casos de câncer de colo é esporádica. Os raros casos familiares pertencem a duas categorias principais:

- **Polipose adenomatosa familiar** ou polipose adenomatosa coli (FAP ou APC, nas siglas em inglês para *familial adenomatous polyposis* e *adenomatous polyposis coli*, respectivamente; OMIM 175100). Uma condição autossômica dominante na qual o colo é recoberto com centenas ou milhares de pólipos. Os pólipos (adenomas) não são malignos, mas, se deixados no local, alguns deles certamente evoluirão para um carcinoma invasivo. A causa é uma mutação herdada no gene supressor de tumor APC (ver Tabela 17.4).
- **Câncer colorretal hereditário não polipose** (síndrome de Lynch I; OMIM 120435 e 120436). Também é autossômico dominante com elevada penetrância, mas, diferentemente da FAP, não existe uma fase precedente de polipose. Os genes causais foram mapeados em duas regiões, 2p21 e 3p21.3, por meio da análise de ligação em famílias afetadas.

Estudos em tumores FAP e nos pólipos que os precedem revelaram perdas de heterozigose (LOHs, do inglês *losses of heterozygosity*) que levaram a uma descrição pioneira e esclarecedora dos eventos moleculares envolvidos na evolução sequencial dos tumores colorretais (ver a seguir). No entanto, estudos similares de LOH em tumores de pacientes com síndrome de Lynch I produziram resultados inesperados e contra intuitivos. Em vez de perder alelos presentes no DNA constitutivo, os tumores pareciam conter alguns novos alelos extras para os marcadores de microsatélite utilizados (Figura 17.19). LOH são pro-



**Figura 17.19 Instabilidade de microsatélite.** Eletroferogramas de dois microsatélites marcadores amplificados por PCR. Linhas superiores: DNA sanguíneo. Linhas inferiores: DNA tumoral. Perceba os picos extras no DNA tumoral. (Cortesia de Lise Hansen, University of Aarhus.)

TABELA 17.5 Genes envolvidos no reparo da replicação do DNA

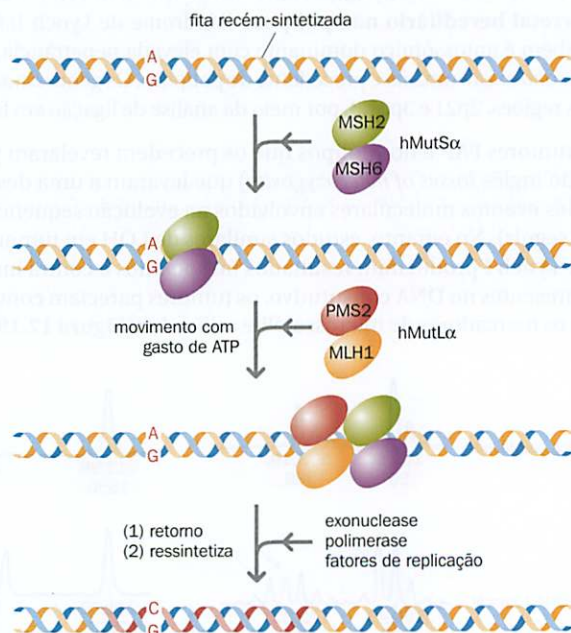
<i>E. coli</i>	Humanos	Localização cromossômica	Frequência na síndrome de Lynch I
<i>MutS</i>	<i>MSH2</i>	2p21	35%
	<i>MSH3</i>	5q14.1	0% <sup>a</sup>
	<i>MSH6</i>	2p16	5% <sup>b</sup>
<i>MutL</i>	<i>MLH1</i>	3p22.2	60%
	<i>MLH3</i>	14q24.3	0% <sup>a</sup>
	<i>PMS2</i>	7p22	poucos casos relatados

<sup>a</sup>Dados de um único grupo e interpretações ambíguas. <sup>b</sup>Síndrome de Lynch I atípica com início tardio e câncer endometrial. Para detalhes, veja Jiricny J & Nystrom-Lahti M (2000) *Curr. Opin. Genes Dev.* 10, 157-162.

priedades de regiões cromossômicas específicas e podem revelar a localização de genes supressores de tumor, mas a instabilidade de microssatélite (MIN, do inglês *microsatellite instability*) na Síndrome de Lynch I é geral. Muitos tumores apresentam instabilidade ocasional de um ou alguns poucos microssatélites, mas uma instabilidade geral com frequência elevada (frequentemente definida como afetando 30% ou mais de todos os marcadores testados) define uma classe de tumores MIN<sup>+</sup> com características clínico-patológicas distintas. A instabilidade de microssatélite é vista em 10 a 15% dos carcinomas colorretal, endometrial e ovariano, mas apenas ocasionalmente em outros tumores.

Em um maravilhoso exemplo de pensamento inovador, Fishel e colaboradores, em 1993, relacionaram o fenômeno MIN<sup>+</sup> a assim chamados genes mutadores em *Escherichia coli* e levedura. Estes genes codificam um sistema de correção de erro que verifica o DNA recém-sintetizado em busca de bases malpareadas (*mismatch*) ou pequenas alças (*loops*) de inserção-deleção. Mutações nos genes *MutHLS*, que codificam o sistema de *E. coli*, levaram a um aumento geral de 100 a 1.000 vezes nas taxas de mutação. Fishel e colaboradores clonaram um homólogo humano de um destes genes, *MutS*, e demonstraram que ele localizava-se em 2p, na posição de um dos genes da síndrome de Lynch I, estando constitutivamente mutado em algumas famílias com a síndrome. Ao todo, seis homólogos dos genes de *E. coli* foram implicados no reparo de *mismatch* em humanos (Tabela 17.5 e Figura 17.20).

Os pacientes com síndrome de Lynch I são constitutivamente heterozigotos para uma mutação de perda de função, quase sempre em *MLH1* ou *MSH2*. Suas células normais ainda possuem um sistema funcional de reparo de *mismatch* e não apresentam o fenótipo MIN<sup>+</sup>. Em um tumor, a segunda cópia é perdida por um dos mecanismos descritos para retinoblastoma ou, pelo menos no caso do *MLH1*, ele pode estar intacto, mas silenciado pela metilação do promotor.



**Figura 17.20 Mecanismo de reparo de mau pareamento.** Erros de replicação podem causar pareamentos incorretos entre bases ou pequenas alças (*loops*) de inserção-deleção. Estes são reconhecidos pelo hMutS $\alpha$ , um dímero das proteínas MSH2 e MSH6, ou às vezes pelo dímero hMutS $\beta$ , formado pelas proteínas MSH2 e MSH3. As proteínas se deslocam ao longo do DNA, ligam-se ao dímero hMutL $\alpha$  (MLH1-PMS2), e montam então o "reparossomo" completo, o qual retorna e ressíntetiza a nova fita.

## 17.6 VISÃO GENÔMICA DO CÂNCER

A tendência geral da pesquisa genética priorizando a análise de genoma completo em detrimento da análise de genes específicos foi especialmente evidente na pesquisa do câncer. Vários grandes projetos colaborativos estão gerando dados de genoma completo em uma escala enorme. O objetivo do *Cancer Genome Anatomy Project* (<http://cgap.nci.nih.gov/>) é a determinação dos perfis de expressão gênica de células normais, pré-câncer e tumorais, levando por fim os melhores detecção, diagnóstico e tratamento para o paciente. O *International Cancer Genome Consortium* (<http://www.icgc.org/home>) tem por meta obter uma descrição abrangente de mudanças genômicas, transcriptômicas e epigenômicas, em 50 tipos e/ou subtipos distintos de tumores que apresentam importância clínica ou social ao redor do mundo.

### Análises citogenéticas e de microarranjo fornecem uma visão de genoma completo das mudanças estruturais

O FISH múltiplo (ver Figura 17.17) torna possível a identificação de todos os rearranjos cromossômicos citogeneticamente visíveis em uma célula tumoral. Resultados desta e de outras técnicas mais antigas estão acumulados na *Mitelman database* (<http://cgap.ncbi.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Até o dia 16 de dezembro de 2009, esta base continha os resultados de 57.402 casos. Em uma escala mais refinada, métodos baseados em microarranjo (*array-CGH* e *chip* de SNP) fornecem informação em escala genômica sobre variações no número de cópias. Por exemplo, Weir e colaboradores catalogaram variações de número de cópias em 371 adenocarcinomas primários de pulmão, por meio da comparação da taxa de intensidade de hibridização entre cada DNA tumoral e um painel de DNAs normais em um *chip* SNP de alta resolução. Estes métodos substituíram estudos de perda de heterozigose em *loci* gênicos individuais e o uso de sondas FISH individuais, embora estes ainda tenham um papel importante no diagnóstico.

### As novas tecnologias de sequenciamento permitem a pesquisa de genoma completo por mudanças de sequência

Técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala estão permitindo aos pesquisadores gerarem uma quantidade sem precedentes de dados de sequência de amostras tumorais. Os estudos podem focar em sequências codificantes ou podem sequenciar todo o genoma tumoral. Na primeira categoria, um notável exemplo de pioneirismo foi o estudo de Greenman e colaboradores, abordando todos os 518 genes conhecidos de proteínas cinases em 210 tumores, representando 10 tipos distintos de câncer. Genes apresentando mutações somáticas não sinônimas foram sequenciados em uma série posterior de 454 tumores. Duas análises independentes de glioblastoma multiforme (um tumor encefálico mortal), relatadas no outono de 2008, apresentaram a crescente extensão do trabalho na área. Parsons e colaboradores sequenciaram todos os éxons codificantes de 20.661 genes codificadores de proteínas em 22 amostras tumorais, enquanto o *Cancer Genome Atlas Research Network* sequenciou éxons de 601 genes selecionados em amostras pareadas tumorais e normais, pertencentes a 91 casos. Ambas as pesquisas complementaram o sequenciamento com estudos de alteração no número de cópias e na expressão gênica. Muitos outros estudos como estes foram relatados.

A primeira sequência de genoma completo de uma célula tumoral foi relatada por Ley e colaboradores em 2008. Ela pertencia a um tipo incomum de tumor, uma leucemia mieloide aguda sem evidências da aquisição de nenhuma anormalidade cromossômica ou de número de cópias, sugerindo que o desenvolvimento tumoral fora guiado por mudanças genéticas de pequena escala. Para gerar dados significativos, é importante checar cada sequência várias vezes (Ley e colaboradores utilizaram uma cobertura de 32 vezes) e sequenciar o DNA normal do mesmo paciente para que mutações somáticas específicas do tumor possam ser distinguidas de outras variantes individuais presentes no genoma normal do paciente. O genoma tumoral apresentou mais de 3,8 milhões de variantes em comparação com a sequência referência padrão do genoma humano. A grande maioria destas também estava presente no genoma normal do paciente, refletindo a individualidade típica dos genomas normais (conforme descrito no Capítulo 13). No entanto, 63 mil mudanças não estavam presentes no genoma normal do paciente, representando mutações somáticas adquiridas.

Um problema central em todos os estudos de sequenciamento diz respeito à distinção entre **mutações ativadoras** (as quais contribuem para a carcinogênese e foram positivamente selecionadas durante a microevolução do tumor) e **mutações passageiras**, que

são consequências acidentais das muitas divisões celulares e da instabilidade genômica das células tumorais. Mutações passageiras são provavelmente muito mais frequentes que mutações ativadoras. Por exemplo, o estudo de glioblastoma multiforme realizado por Parsons e colaboradores identificou uma ou mais mudanças não silenciosas em sequências codificantes em 685 dos 20.661 genes estudados, com uma média de 47 mutações por tumor. Dados combinados do sequenciamento (incluindo testes limitados de outras 83 amostras tumorais), mudanças no número de cópias e dados de expressão sugerem que 42 destes genes podem abrigar mutações ativadoras.

Estes e outros resultados similares demonstram claramente a complexidade e a heterogeneidade da tumorigênese. Tumores individuais apresentam grande quantidade de mutações, e, mesmo entre tumores do mesmo tipo, existe apenas uma limitada sobreposição. Para extrair padrões significativos, o *International Cancer Genome Consortium* planeja sequenciar pelo menos 2.000 genes em 250 amostras de 50 tipos tumorais, totalizando 12.500 amostras. A revisão realizada por Stratton, Campbell e Futreal fornece uma boa imagem das conquistas deste trabalho e dos desafios que ele enfrenta.

### Técnicas posteriores fornecem uma visão genômica das mudanças epigenéticas nos tumores

Padrões de metilação do genoma completo podem ser investigados pelo uso de anticorpos específicos para precipitar DNA metilado. As sequências presentes no imunoprecipitado são identificadas pela hibridização de microarranjos ou pelo sequenciamento em larga escala (*ChIP-chip* ou *ChIP-seq*, ver no Capítulo 11). A comparação com o padrão de metilação na célula normal correspondente permite a caracterização do epigenoma tumoral. O *array*-CGH pode ser utilizado para realizar a comparação diretamente. A hipometilação degenerada é uma característica de praticamente todas as células tumorais. Presumivelmente, o resultado é a ativação de vários genes cuja expressão é normalmente reprimida pela metilação. Esta é uma das primeiras mudanças observáveis e, conforme discutido em uma revisão de Feinberg, Ohlsson e Henikoff, alguns pesquisadores especulam que esta mudança epigenética seja central a tumorigênese.

Sobreposta à hipometilação geral existe a hipermetilação de ilhas CpG nos promotores de genes específicos. Esta pode ser estudada pela hibridização entre DNA tratado com bissulfato e um microarranjo específico. Conforme descrito anteriormente (ver Quadro 11.4), o bissulfato de sódio converte citosina em uracila, mas deixa a 5-metilcitosina intacta. Sondas de oligonucleotídeos no microarranjo hibridizam especificamente com a sequência convertida ou com a não convertida. Com esta abordagem, o *Cancer Genome Atlas Research Network* testou 2.305 genes para metilações de promotores específicas de tumores em seu estudo de glioblastoma multiforme descrito anteriormente. Isto revelou a metilação específica do promotor do *MGMT*, um gene que codifica uma enzima de reparo de DNA que remove grupos alquil de resíduos de guanina. Tumores com esta característica apresentaram hipermetilação difusa, com um espectro específico de mudanças na sequência de nucleotídeos.

Os tumores em muitos órgãos podem ser divididos naqueles que apresentam metilação de muitas ilhas CpG (fenótipo de metilação de ilhas CpG;  $CIMP^+$ , do inglês *CpG island methylation phenotype*) e naqueles que são  $CIMP^-$ . Embora os mecanismos e as implicações não sejam atualmente conhecidos, defende-se que tumores  $CIMP^+$  formam um subgrupo clínico e etiologicamente distinto. O fator subjacente a estes padrões pode ser a atividade do grupo de proteínas de remodelamento de cromatina conhecido como *polycomb* (ver Capítulo 11).

### Visões genômicas da expressão gênica são utilizadas para gerar assinaturas de expressão

Os patologistas sempre classificaram os tumores pela sua aparência no microscópio (ver Figura 17.1); no entanto, a partir da metade da década de 1990, um esforço substancial foi dedicado ao desenvolvimento de classificações baseadas em padrões da expressão gênica. A maioria dos pesquisadores utiliza microarranjos. Uma alternativa é o sequenciamento do cDNA total, seja diretamente ou na forma de marcadores curtos concatenados (SAGE, do inglês *Serial Analysis of Gene Expression*; ver Capítulo 11). O sequenciamento produz dados que são mais quantitativos, e a precisão da quantificação pode ser aumentada em qualquer proporção sequenciando-se mais moléculas individuais.

Em um experimento típico, um microarranjo contendo sondas para cada gene humano é utilizado para comparar RNA ou cDNA de um tumor com RNA ou cDNA de um tecido normal correspondente. Isto pode ser realizado diretamente em uma hibridização compe-



titiva ou por duas hibridizações sequenciais. Alternativamente, RNAs ou cDNAs de uma série de tumores podem ser utilizados para procurar por padrões comuns ou por diferenças significativas. O controle metucioso das condições experimentais, além do filtro e processamento cuidadoso dos dados brutos, é necessário para produzir resultados reproduzíveis. Os dados processados são apresentados como uma matriz na qual cada coluna mostra os dados para uma amostra e cada linha mostra os dados para um gene. As células da matriz são coloridas para indicar níveis de expressão aumentados, diminuídos ou inalterados.

O desafio é extrair padrões significativos da matriz. O objetivo pode ser o encontro de assinaturas de expressão gênica – padrões de superexpressão ou baixa expressão de um número limitado de genes – as quais são correlacionadas com variáveis clínicas conhecidas e podem servir para prever aquela variável em um caso desconhecido. Alternativamente, o objetivo pode ser identificar similaridades e diferenças inesperadas entre amostras que possam definir novas classes de tumor. Métodos de clusterização hierárquica rearranjam as linhas e colunas da matriz para maximizar similaridades.

MicroRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificadores que se acredita possuem um papel regulatório, também têm sido alvo de perfis de expressão de todo o genoma. Os perfis mostram mudanças características em diferentes tipos tumorais. Muitos miRNAs são regulados negativamente em muitos tumores. Isso sugere uma dediferenciação geral das células, uma reversão para um estado mais embrionário. A expressão de miRNA tende a aumentar conforme as células se diferenciam.

Sobrepostas em um decréscimo geral na expressão de miRNA, as células cancerosas mostram perfis de expressão de miRNA anormais. Lu e colaboradores reportaram perfis de 217 miRNAs em 334 amostras de tecido humano normal e vários tumores (ver Leituras adicionais). Os perfis foram incrivelmente diversos e mais valorosos do que os perfis de mRNA para discriminar entre diferentes tipos de tumores e entre células tumorais e normais. Outros pesquisadores mostraram que a superexpressão de um miRNA, o miR-10b, em tumores de mama não metastáticos desencadeou a invasão. A progressão clínica de tumores de mama primários correlacionou-se com os níveis de miR-10b. Outros miRNAs (miR-126 e miR-335) tiveram o efeito contrário: células de câncer de mama metastático perderam a expressão desses dois miRNAs, sendo que o restabelecimento da sua expressão diminuiu o potencial metastático das células.

Os dados atualmente disponíveis são confusos, mas alguns genes de miRNAs individuais de fato cumprem os critérios para oncogenes ou genes supressores de tumor. Isso porque eles controlam a expressão de um dos oncogenes clássicos mais bem conhecidos ou genes supressores de tumor, ou podem refletir alguma ação independente do miRNA.

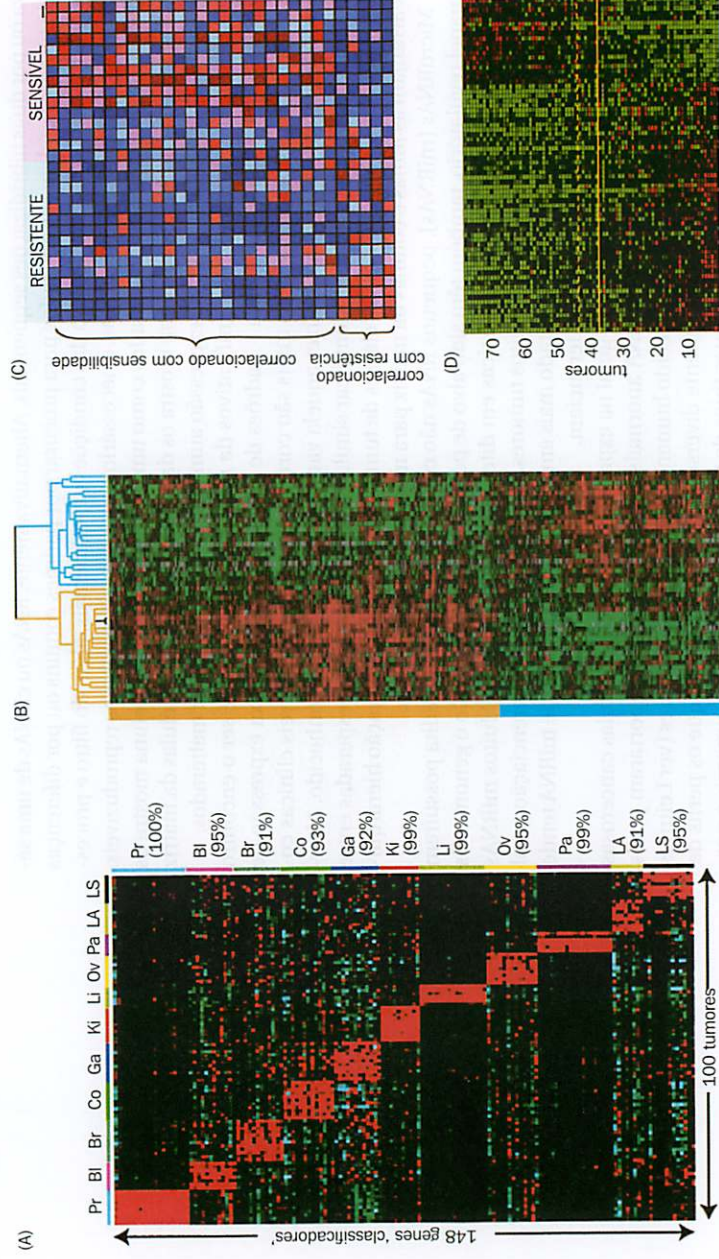
O perfil de expressão tem sido utilizado amplamente e com sucesso para identificação de categorias distintas de tumor (descoberta de classe). A **Figura 17.21** mostra exemplos típicos. O objetivo eventual deve ser o desenvolvimento de indicadores prognósticos e preditivos. Indicadores prognósticos prediriam a provável sobrevivência do paciente, independentemente do tratamento. Indicadores preditivos prediriam quais tratamentos teriam mais chance de sucesso com aquele tumor em particular. O quanto o perfil de expressão avançou no sentido de tal relevância clínica direta é discutido no Capítulo 19.

## 17.7 DESVENDANDO A EVOLUÇÃO EM MÚLTIPLOS ESTÁGIOS DE UM TUMOR

Como enfatizado no início deste capítulo, todos os cânceres são o resultado de um processo microevolucionário que progride por meio de uma série de estágios. O entendimento completo de qualquer câncer requer uma descrição dos estágios sucessivos no seu desenvolvimento. O entendimento de evolução tumoral é melhor desenvolvido para cânceres colorretais, pois todos os estágios do desenvolvimento tumoral podem ser estudados no colo ressecado de pacientes com polipose adenomatosa familiar (PAF).

### A microevolução do câncer colorretal tem sido particularmente bem documentada

As lesões mais precoces no epitélio colônico, anteriormente normais, são focos crípticos microscópicos aberrantes. Estes podem se desenvolver em crescimentos epiteliais benignos chamados pólipos ou adenomas. Adenomas evoluem por meio de estágios precoces (menos de 1 centímetro de tamanho), intermediários (maior que 1 centímetro, mas sem focos de carcinoma) e tardios (maior que 1 centímetro e com focos de carcinoma) para se tornarem carcinomas, os quais finalmente sofrem metástase. Para cada estágio, uma

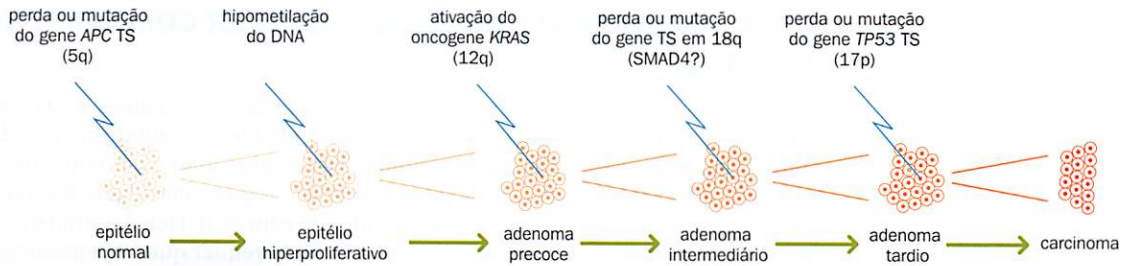


**Figura 17.21 Exemplos da utilização de arranjos de expressão para caracterização de tumores.** (A) Identificação do tecido de origem.

Padrões de expressão de 148 genes (linhas) classificam 100 tumores (colunas) por origem. Pr, próstata; Bl, Bexiga/ureter; Br, mama; Co, colorretal; Ga, gástrico; Ki, rim; Li, fígado; Ov, ovário; Pa, pâncreas; LA, adenocarcinoma de pulmão; LS, carcinoma de célula escamosa de pulmão. Vermelho indica aumento da expressão gênica, azul indica diminuição da expressão. (B) Distinção de dois tipos de linfoma difuso de grandes células B. A clusterização da expressão gênica distingue tumores semelhantes ao centro germinativo (barras em laranja) de tumores semelhantes a células B ativadas (barras em azul). Sobrevida de cinco anos em ambos os grupos é de 76 e 16%, respectivamente. (C) Sensibilidade aos medicamentos quimioterápicos. Perfis de expressão de 6.817 genes em 60 linhagens celulares tumorais foram correlacionados com a resposta a 232 tipos de medicamentos. A figura mostra padrões de expressão gênica (linhas) em 30 linhagens celulares (colunas) que predizem a sensibilidade ou resistência a um fármaco, a citocalasina D. (D) Predição do resultado clínico do câncer de mama. Os padrões de expressão de 25 mil genes foram anotados para 98 cânceres de mama primários. A figura mostra perfis de 70 genes marcadores prognósticos (linhas) em 79 cânceres (colunas). Todos os pacientes passaram por cirurgia e radioterapia; a linha sólida em amarelo divide aqueles para os quais foi predito que seria necessária quimioterapia adicional (acima da linha) daqueles que não precisaram desse desagradável tratamento. [(A) de Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM et al. (2001) *Cancer Res.* 61, 7388-7393. Com permissão de American Association for Cancer Research. (B) de Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. (2000) *Nature* 403, 503-511. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd. (C) de Staunton JE, Slonim DK, Coller HA et al. (2001) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 98, 10787-10792. Com permissão de National Academy of Sciences. (D) dados de van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. (2002) *Nature* 415, 530-536. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.]

amostra de lesões pode ser utilizada para formar um panorama geral das mudanças moleculares características de cada estágio. Algumas mudanças são frequentes em lesões que se encontram em um estágio inicial, enquanto outras normalmente aparecem de forma tardia. As principais observações são as seguintes:

- As lesões detectadas precocemente, focos crípticos aberrantes, não expressam *APC*. Em pessoas com PAF, as quais possuem uma mutação herdada de perda de função no gene *APC* em cada célula, cerca de uma célula epitelial em cada  $10^6$  células se desenvolve em um póliipo. Esta taxa é consistente com a perda do segundo alelo de *APC*, sendo este o evento determinante.
- Adenomas em estágio precoce, como a maioria das células cancerosas, demonstram uma hipometilação global das sequências CpG no DNA. Apesar da hipometilação global, ilhas CpG nos promotores de genes específicos são hipermetilados, como mencionado previamente.
- Cerca de 50% dos adenomas intermediários e tardios e somente cerca de 10% dos adenomas precoces possuem mutações no oncogene *KRAS*. Assim, as mutações *KRAS* podem, frequentemente, ser requeridas para progressão de adenomas precoces para adenomas intermediários.
- Cerca de 50% dos adenomas e carcinomas tardios apresentam perda da heterozigotidade em 18q. Isso é relativamente incomum em adenomas precoces e intermediários. Parece provável que o gene relevante é o *SMAD4*, e não o candidato inicial, o gene *DCC*.



**Figura 17.22 Um modelo para o desenvolvimento de múltiplos estágios do câncer de colo.** Em muitos tumores, perda, ativação ou mutação de certos genes são vistas em estágios histológicos particulares, como descrito no texto. Isso é primariamente uma ferramenta para se pensar sobre como os tumores se desenvolvem, em vez de uma descrição firme. É provável que cada câncer colorretal tenha se desenvolvido por meio dos mesmos estágios histológicos, mas as mudanças genéticas subjacentes são mais variadas.

- Carcinomas colorretais, mas não os adenomas, possuem uma frequência bastante elevada de perda ou mutações do gene *TP53*.

Essas observações têm sido sumarizadas no muito citado ‘Vogelgrama’ da **Figura 17.22**. Este esquema não deve ser superinterpretado; é um modelo para pensar sobre a evolução em múltiplos estágios do câncer e não uma descrição de como sempre acontece. Como as estatísticas supracitadas mostram, muitos cânceres de colo não demonstram essas mudanças. De fato, somente cerca de 60% possuem mutações no gene *APC*, sendo que os tumores da síndrome de Lynch tipo I seguem uma rota diferente.

Esquemas similares, mas mais rudimentares, podem ser feitos para outros tumores para os quais os dados não são tão ricos. As mutações precoces na evolução de múltiplos passos de um tumor são mais críticas do que as tardias, pois pode haver apenas algumas poucas maneiras nas quais um pequeno número de mutações pode modificar o comportamento de uma célula até então normal que possui todas as suas defesas intactas. A instabilidade genômica dos estágios tardios permite uma gama muito maior de possibilidades sobre as quais a seleção natural pode agir. De acordo com a hipótese de *gatekeeper*, de Kinzler e Vogelstein, em uma dada população de células em renovação um gene em particular é responsável por manter um número de células constante. A mutação de um *gatekeeper* leva ao desbalanceamento permanente entre divisão e morte celular, enquanto mutações em outros genes não possuem um efeito de longo prazo se o *gatekeeper* estiver funcionando corretamente. Os genes supressores de tumor identificados por estudos dos cânceres mendelianos são os prováveis *gatekeepers* para o tecido envolvido, como, por exemplo, o gene *RB1* nas células progenitoras da retina, o gene *NF2* nas células de Schwann, e o gene *VHL* nas células renais. Casos esporádicos precisariam sofrer duas mutações sucessivas no *gatekeeper* – mas, como foi visto anteriormente para o retinoblastoma, isso é compatível com o tamanho normal da população de células-alvo e com a raridade relativa de cada câncer esporádico específico. Alguns cânceres comuns, como o câncer de pulmão ou de próstata, não possuem formas mendelianas claras. Esses se colocam como um problema para a hipótese do *gatekeeper*, pois sugerem que nenhuma mutação inicial única aumenta substancialmente a probabilidade de que um tumor venha a se desenvolver.

Interessantemente, mutações herdadas no gene *APC* são quase sempre mudanças na troca de sentido (68%) ou mutações sem sentido (30%), enquanto as mutações somáticas (segunda maior ocorrência em casos familiares, e ambas as mutações em tumores esporádicos) raramente inativam o gene por completo. Isso se encaixa bem na hipótese de *gatekeeper*. Pessoas com PAF herdada permanecem normais e saudáveis até que uma célula sofra uma segunda mutação; deveria haver alguma diferença entre as suas mutações herdadas e as mutações somáticas que são postuladas como modificadoras do comportamento celular. Entretanto, esse argumento parece específico para o gene *APC*. Talvez seja relevante que a proteína APC não regule apenas o nível de  $\beta$ -catenina, um controlador crítico para o crescimento celular (ver adiante), mas também tenha um papel para assegurar a estabilidade cromossômica. A proteína APC ajuda a assegurar a ligação do fuso dos microtúbulos ao cinetócoro dos cromossomos. Já se destacou que mesmo adenomas bastante precoces demonstram instabilidade cromossomal. É provável que uma única mutação *APC* (do tipo correto) já confira uma vantagem no crescimento do epitélio colônico, enquanto mutações de um único gene *BRCA1/2* não fornecem vantagem ao epitélio ductal. Isso pode explicar porque a mutação *APC* é bastante comum no câncer de colo esporádico, mas o silenciamento de *BRCA1/2* é visto somente entre 10 e 15% dos cânceres de mama esporádicos.

## 17.8 INTEGRANDO OS DADOS: CÂNCER COMO BIOLOGIA CELULAR

Como foi evidenciado no início deste capítulo, a genética do câncer pode ser bastante confusa. Tantos genes, tantas mutações, uma infinidade de combinações; cada tumor é único. Mas o que eles todos têm em comum é que cada tumor é o produto da seleção de um conjunto específico de capacidades definidas – as seis capacidades listadas no início deste capítulo, as quais são marcos das células do câncer. Relacionar mudanças no DNA com o comportamento geral de uma célula tumoral requer que se pense no câncer em termos de biologia celular.

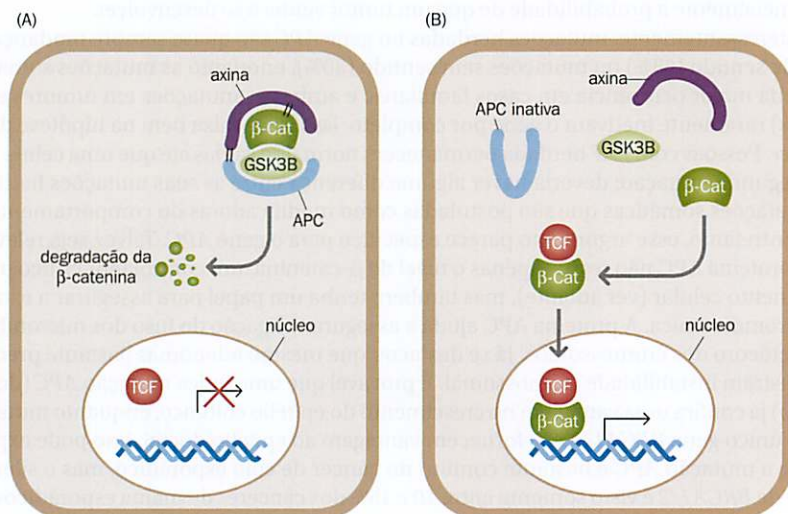
### A tumorigênese deve ser considerada em termos de vias, não de genes individuais

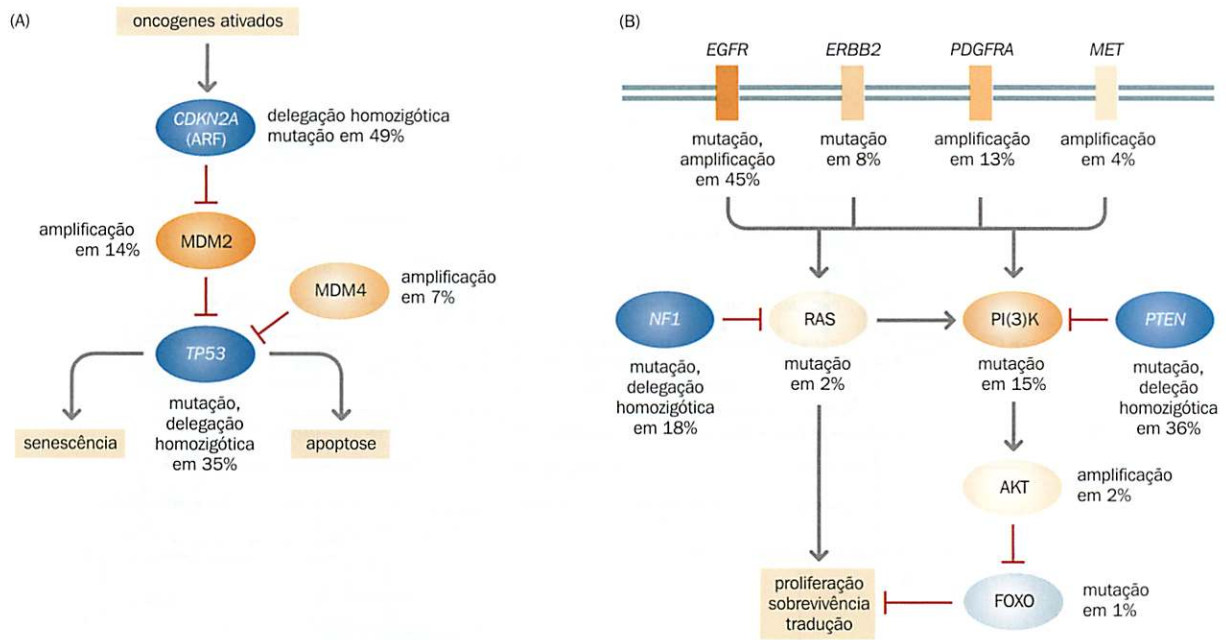
Quando se pensa em termos de vias em vez de genes individuais, há apenas um número limitado de maneiras de se alcançar aquelas capacidades essenciais. Por exemplo, o esquema da Figura 17.22 pretende mostrar as mudanças mais comuns em cada estágio da evolução do câncer colorretal – mas relativamente poucos tumores aderem estritamente às especificações deste esquema. Em uma série de 106 tumores reportados por Smith e colaboradores, em 2002, somente sete possuíam mutações em todos os três genes *APC*, *KRAS* e *TP53*. Algo da heterogeneidade desaparece quando se pensa em termos de vias, em vez de mutações gênicas individuais:

- Tumores que não têm as mutações *APC* possuem, frequentemente, mutações de ativação na  $\beta$ -catenina ou, algumas vezes, mutações de inativação na axina. A Figura 17.23 mostra que um papel principal da proteína APC é manter os níveis de  $\beta$ -catenina baixos, reduzindo a transcrição dos genes como *MYC* e ciclina D1 pelo fator de transcrição TCF/LEF (fator de ligação linfóide-estimulante). A axina colabora nesse processo.
- Tumores que não têm a mutação *KRAS* possuem, frequentemente, mutações *BRAF*. *BRAF* age a jusante de *KRAS* na mesma via intracelular pela qual os sinais dos receptores celulares de superfície ativam a MAP cinase (ver Figura 4.15). Um estudo de 330 tumores colorretais por Rajagopalan e colaboradores identificou 169 com mutações em *KRAS* e 32 com mutações em *BRAF* – mas nenhum tumor possuía mutações em ambos os genes.
- Tumores PAF tendem a perder o cromossomo 18q, mas os tumores da síndrome de Lynch tipo I são cromossomicamente estáveis e mantêm o cromossomo 18q. A pressão seletiva em ambos os casos é, provavelmente, uma perda na sinalização de inibição de crescimento do TGF- $\beta$ . Na PAF, isso ocorre, frequentemente, pela perda do efector a jusante *SMAD4*, localizado em 18q. Na síndrome de Lynch tipo I, 90% dos tumores MIN<sup>+</sup> possuem mutações de troca de sentido em uma fila de oito adeninas consecutivas no gene do receptor de TGF- $\beta$  II.

**Figura 17.23** A via APC no câncer

**colorretal.** (A) Um papel principal da proteína APC é se ligar à  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -Cat), a qual é, por conseguinte, marcada para destruição. A axina colabora neste processo. GSK3B, glicogênio sintase cinase 3B. (B) A perda da função da APC permite que a  $\beta$ -catenina se acumule e se ligue ao fator de transcrição TCF/LEF (fator de ligação linfóide-estimulante), promovendo assim a transcrição de genes como *MYC* e ciclina D1. Entretanto, há outras maneiras de se alcançar o mesmo efeito (ver o texto). [Adaptada de Fearnhead NS, Britton MP & Bodmer WF (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10, 721-733. Com permissão de Oxford University Press.]





Assim, por trás da heterogeneidade dos eventos moleculares, há um panorama muito mais regular das vias que precisam ser inativadas para um tumor se desenvolver. Na revisão de 2002, Hahn e Weinberg tentaram listar todas essas vias e elaborar um “mapa de rotas” do câncer. A geração atual de investigações sobre o genoma inteiro de diferentes tipos de tumores está fornecendo muitos exemplos concretos (Figura 17.24), e a revisão de Vogelstein e Kinzler fornece muitos outros. A Figura 12.11 fornece uma impressão de quão complexo um panorama total seria.

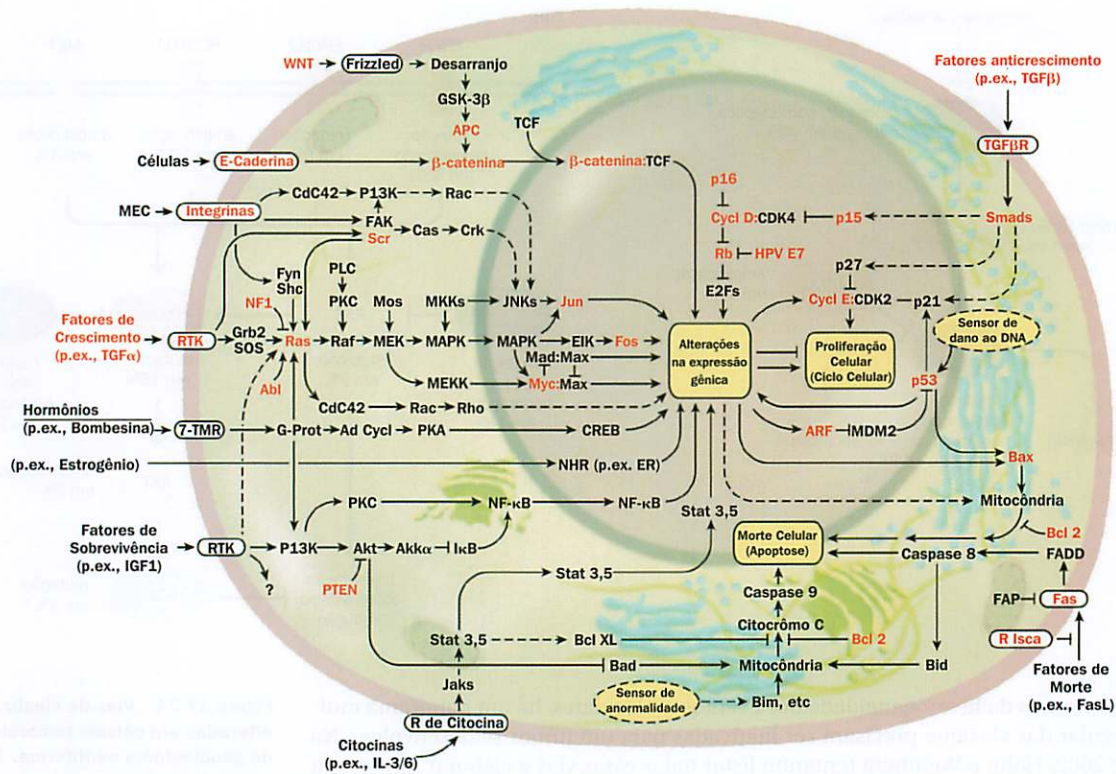
### Tumores malignos devem ser capazes de estimular angiogênese e metástase

Das seis capacidades que um tumor maligno deve adquirir, já se viu os papéis de oncogenes ativados, perturbação do controle do ciclo celular, mutação da p53 e reativação da telomerase para alcançar as quatro primeiras capacidades da lista. As capacidades finais são angiogênese e metástase.

Depois que um tumor alcança um volume de 2 a 3 mm<sup>3</sup>, ele se torna dependente da produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese) para obter um suprimento adequado de oxigênio e nutrientes. A capacidade de angiogênese sustentada depende da troca angiogênica que tanto regula positivamente fatores pró-angiogênicos como regula negativamente inibidores da angiogênese. Diferentes tipos de tumores podem utilizar diferentes estratégias moleculares para ativar essa troca. Muitas citocinas e outras moléculas de sinalização estão envolvidas. Membros da família de proteínas do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) possuem papéis proeminentes nesse aspecto. A expressão é regulada positivamente em muitos tumores, sendo que o VEGF é o alvo de fármacos anticâncer como a Avastina<sup>®</sup>. A hipóxia desencadeia a expressão de muitos genes por meio da estabilização do fator de transcrição HIF1 $\alpha$  (Fator Induzível de Hipóxia 1 $\alpha$ ). Uma síndrome cancerosa hereditária, a síndrome von Hippel-Lindau (ver Tabela 17.4), é causada pela perda da proteína que normalmente mantém os níveis de HIF1 $\alpha$  baixos por meio da ubiquitinação e marcação para degradação.

A metástase pode não ser uma capacidade especificamente selecionada, pois a sua habilidade não é claramente vantajosa para qualquer célula em um tumor primário. Algumas capacidades que são vantajosas para tumores primários também, incidentalmente, facilitam a metástase. Tumores precisam ser altamente vascularizados, mas isso também aumenta as oportunidades para as células deixarem o tumor e viajarem por todo o corpo. Tumores primários precisam ser invasivos para obter espaço para o crescimento, mas a diminuição da adesão celular e o aumento da habilidade em romper tecidos também auxiliam a metástase. Por outro lado, uma série de funções não é importante para tumores primários, mas é necessária para permitir que uma célula tumoral recém-implantada estabeleça uma colônia em uma nova localização. A revisão por Nguyen e Massagué discute esses assuntos.

**Figura 17.24 Vias de sinalização alteradas em células tumorais de glioblastoma multiforme.** Uma variedade de diferentes sequências ou mudanças no número de cópias entre componentes das vias são vistas em diferentes tumores individuais. (A) Em 87% dos tumores, as vias por meio das quais p53 afeta a senescência e a apoptose são comprometidas por uma variedade de diferentes mudanças genéticas. (B) Em 88% dos tumores, várias mudanças genéticas afetam as vias pelas quais os receptores de tirosina cinases (EGFR, ERBB2, PDGFRA e MET) agindo por meio de RAS e PI(3)K (fosfoinositídeo 3-cinase) controlam a proliferação celular e a sobrevivência. Amarelo indica alterações genéticas de ativação, com genes frequentemente alterados mostrando tons mais profundos de amarelo. Azul indica mutações de inativação, com tons mais escuros correspondendo a porcentagens mais elevadas de alterações. [Dados do Cancer Genome Atlas Research Network (2008) *Nature* 455, 1061-1068. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.]



**Figura 17.25** Vias importantes para a aquisição de capacidades de células cancerosas. Essa figura é uma tentativa inicial de mostrar o envolvimento de oncogenes e genes supressores de tumor (mostrados em vermelho) em várias vias que afetam a escolha da célula para progredir por meio do ciclo celular, sair do ciclo ou sofrer apoptose. Muitos exemplos específicos são discutidos por Hanahan e Weinberg, de onde essa figura foi retirada. RTK, receptor tirosina-cinase; 7-TMR, receptor de superfície celular com 7 segmentos transmembrana; ECM, matriz extracelular. [De Hanahan D & Weinberg RA (2000) *Cell* 100, 57-70. Com permissão de Elsevier.]

### A biologia de sistemas pode, por fim, permitir uma visão unificada do desenvolvimento tumoral

Cada uma das seis capacidades listadas por Hanahan e Weinberg pode ser adquirida por uma variedade de diferentes mudanças genéticas, mas em cada caso a sua obtenção requer que certas vias específicas sejam ativadas ou inativadas. A Figura 17.25, obtida da revisão de Hanahan e Weinberg, mostra algumas das vias-alvo. As capacidades não são necessariamente adquiridas na mesma ordem em diferentes tumores, mas os requerimentos para instabilidade genômica e expansões clonais sucessivas em estágios intermediários impõem uma certa regularidade nesse processo.

Todas essas vias são utilizadas para conduzir uma célula em certas direções em condições particulares (Figura 17.26A). A vida seria muito simples se o sinal e a resposta fossem conectados por uma via linear e não ramificada (Figura 17.26B), mas esse parece nunca ser o caso. Em vez disso, ramificações múltiplas, sobreposição e vias parcialmente redundantes controlam o comportamento das células (Figura 17.26C). Essas complicadas vias são provavelmente necessárias para conferir estabilidade e resiliência para a maquinaria extraordinariamente complexa de uma célula. Experimentalmente, revelar precisamente os controles do circuito genético é extremamente difícil, em parte por causa da sua complexidade e em parte porque é difícil distinguir efeitos diretos de indiretos em experimentos de transfecção ou *knockout*. A ciência da biologia de sistemas é devotada à modelagem quantitativa de tais redes, e uma das suas principais aplicações é no câncer. Quando se tornar disponível uma descrição quantitativa completa da rede de controles em cada diferente tipo celular, será possível realmente entender o câncer.

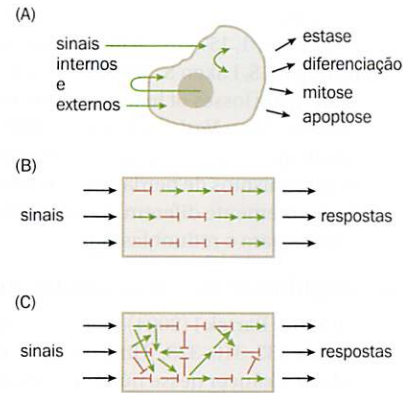
### CONCLUSÃO

O câncer é o resultado de um processo microevolucionário darwiniano entre as células do corpo humano. Assim como na evolução de uma população de animais, células individuais adquirem mutações de forma aleatória, e a seleção natural favorece qualquer célula que contenha mutações que permitam a sua reprodução mais rápida ou a habilidade em resistir de melhor forma à morte em relação às células circundantes. Para se tornar uma célula cancerosa, ela precisa ser capaz de continuar replicando, independente de sinais de crescimento ou anticrescimento externos. Isso requer várias mutações sucessivas para desregular múltiplas vias regulatórias.

Genes que normalmente agem para estimular o crescimento sofrem mutações de ativação e são conhecidos como oncogenes; em contrapartida, aqueles que normalmente agem para restringir o crescimento sofrem mutações de inativação e são conhecidos como genes supressores de tumor. A instabilidade genômica permite a acumulação mais rápida de mutações subsequentes. Estas consistem em um pequeno número de mutações indutoras e um número muito maior de mutações passageiras. Mutações indutoras contribuem para o desenvolvimento do tumor e são selecionadas positivamente; mutações passageiras são produtos secundários incidentais do desenvolvimento tumoral. Depois de muitas rodadas de replicação controlada pela doença com altas taxas de mutação, os tumores passam a conter uma coleção heterogênea de clones, provavelmente mantidos por uma pequena população de células-tronco cancerosas.

Enquanto a evolução de uma população de organismos é provocada pela seleção natural de mutações na linhagem germinativa, a microevolução de um tumor depende da seleção de mutações somáticas. No entanto, certas mutações de predisposição podem ser passadas por meio de gerações na linhagem germinativa, causando várias síndromes raras de câncer familiar. Isso pode acontecer porque as mutações em muitos genes supressores de tumor não possuem efeito fenotípico até que ambos os alelos estejam inativados (como Knudson postulou, eles devem sofrer dois golpes). Uma única mutação de inativação pode ser transmitida por meio da linhagem germinativa, dessa forma estando presente em cada célula da prole. Tais células continuam funcionando normalmente, mas ficam vulneráveis a uma única mutação que inative o alelo funcional remanescente. Esta é uma ocorrência muito mais frequente do que duas mutações acontecerem, ao acaso, em uma única célula normal, sendo que o resultado é um alto risco de o câncer ser herdado.

Cada tumor é um produto único de um processo microevolucionário separado, o qual contém um espectro único de mutações indutoras e passageiras. Entretanto, todos os tumores precisam ter adquirido um grupo específico de capacidades: além da independência dos sinais de crescimento e anticrescimento externos, os tumores precisam evitar a apoptose, replicar-se indefinidamente, desenvolver seus próprios suprimentos sanguíneos (angiogênese) e, em tumores malignos, invadir outros tecidos para estabelecer tumores secundários. Essas capacidades dependem da subversão da mesma rede de vias de sinalização em um dado tipo celular. Assim, considerando-se em termos de vias, os tumores são muito menos heterogêneos do que quando mutações gênicas individuais que eles contêm são listadas. O entendimento do câncer requer uma visualização quantitativa e ampla do genoma, de como as redes de sinalização funcionam em células normais de cada tipo particular. Somente quando se obtiver tal panorama será possível entender o quanto mudanças genéticas e epigenéticas específicas podem desestabilizar a rede e permitir que um tumor se desenvolva.



**Figura 17.26** As opções abertas a uma célula, e como ela escolhe. (A) Em resposta a sinais internos e externos, uma célula escolhe entre a estase, mitose, apoptose e, algumas vezes, a diferenciação. (B) Uma célula imaginária onde os sinais são ligados às respostas por vias de estimulação (→) ou inibição (—) lineares e não ramificadas. (C) Em células reais, os sinais alimentam uma rede complexa de interações parcialmente redundantes, cujo resultado não é fácil de ser predito analiticamente.

## LEITURAS ADICIONAIS

### A evolução do câncer

- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70. [Uma importante revisão que introduz o conceito das seis capacidades essenciais de uma célula tumoral e fornece diversos exemplos.]
- Rosen JM & Jordan CT (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670–1673. [Uma revisão sobre as controvérsias e as complexidades sobre o conceito de célula-tronco cancerosa.]

### Oncogenes

- Bishop JM (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 301–354. [Uma boa revisão dos primeiros estudos desenvolvidos com oncogenes.]
- Boxer LM & Dang CV (2001) Translocations involving *c-myc* and *c-myc* function. *Oncogene* 20, 5595–5610. [Uma visão da complexidade do linfoma de Burkitt e de outras translocações de *MYC*.]
- Cancer Gene Census. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census> [Um banco de dados de genes para os quais mutações foram implicadas como causadoras de câncer.]

- Meyer N & Penn LZ (2008) Reflecting on 25 years with *MYC*. *Nat. Rev. Cancer* 8, 976–990. [Uma revisão histórica que ilustra as diversas funções de um dos principais oncogenes.]
- Mitelman F, Johansson B & Mertens F (eds) (2002) Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Mitelman F, Johansson B & Mertens F (2007) Banco de dados de aberrações cromossômicas em câncer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 233–244.

### Genes supressores de tumor

- Burkhart DL & Sage J (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671–682. [Uma revisão aprofundada das funções da proteína pRb.]
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA et al. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779–784. [O artigo que estabeleceu a hipótese de dois golpes de Knudson. Alguns dos dados são derivados de um artigo anterior, Godbout R, Dryja TP, Squire J et al. (1983) Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nature* 304, 451–453.]
- Fodde R & Smits R (2002) One-hit carcinogenesis. *Science* 298, 761–763. [Exemplos de haploinsuficiência em genes supressores de tumor.]

Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 157–162. [Uma revisão da hipótese de dois golpes.]  
 Thiagalingam S, Laken S, Willson JK et al. (2001) Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 2698–2702. [Um ótimo estudo que utiliza marcadores de DNA e FISH para identificar os mecanismos de perda em 62 tumores. Os mecanismos frequentemente diferem daqueles descritos por Cavenee e colegas para o retinoblastoma.]

### Desregulação do ciclo celular no câncer

Kastan MB & Bartek J (2004) Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323. [Uma das oito revisões sobre divisão celular e câncer nesse número da revista *Nature*. Essa revisão está centrada na resposta a danos no DNA.]  
 Kops GJPL, Weaver BAA & Cleveland DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5, 773–785. [Fornece detalhes dos mecanismos de ponto de checagem mitóticos.]  
 Malumbres M & Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641. [Uma revisão geral das cinases dependentes de ciclina e suas funções.]  
 Malumbres M & Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166. [Sugere que Cdk1 é a única cinase dependente de ciclina geralmente essencial; outras podem ter funções especializadas em determinados tipos de células.]  
 Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298–306. [Uma revisão detalhada dos mecanismos que controlam a progressão pela fase G<sub>1</sub> e ao longo do limiar G<sub>1</sub>/S.]

### Instabilidade genômica

Brennan P, McKay J, Lee M et al. (2007) Uncommon *CHEK2* missense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: case-control study. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1794–1801. [Um estudo interessante e que vale ser lido, apresentando uma clara discussão dessa inesperada descoberta – mas que não é um alento para fumantes!]  
 Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R et al. (2005) Germ line susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 112–119.  
 Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS et al. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027–1038. [A identificação de mutações em *MSH2* como causadoras de defeitos de reparo de pareamento em humanos.]  
 Hoeijmakers J (2009) DNA damage, aging and cancer. *New Engl. J. Med.* 361, 1475–1485.

### Visão ampla do genoma no câncer

Cancer Genome Anatomy Project. <http://cgap.nci.nih.gov/>  
 [Projeto cujo objetivo é “determinar os perfis de expressão gênica em células normais pré-cancerosas e cancerosas, permitindo uma eventual melhoria na detecção, no diagnóstico e no tratamento do paciente”]  
 Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.  
 Feinberg AP, Ohlsson R & Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* 7, 21–32. [Argumenta que um evento epigenético precoce é crucial para a tumorigênese.]  
 Greenman C, Stephens P, Smith R et al. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153–158.

[Análise da sequência de 518 genes de proteínas tirosina cinases em 210 diferentes cânceres humanos.]

International Cancer Genome Consortium. <http://www.icgc.org/home> [Projeto cujo objetivo é obter uma descrição compreensiva das alterações genômicas, transcriptômicas e epigenômicas de 50 diferentes tipos e/ou subtipos de tumor clinicamente ou socialmente importantes em todo o mundo.]  
 Ley TJ, Mardis ER, Ding L et al. (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456, 66–72. [A primeira sequência completa de um genoma de câncer.]  
 Lu J, Getz G, Miska E et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838.  
 Ma L, Teruya-Feldstein J & Weinberg RA (2007) Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449, 682–688.  
 Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812.  
 Quackenbush J (2006) Microarray analysis and tumor classification. *N. Engl. J. Med.* 354, 2463–2472. [Uma descrição clara e de fácil leitura mostrando como dados de microarranjos são processados e interpretados.]  
 Stratton MR, Campbell PJ & Futreal PA (2009) The cancer genome. *Nature* 458, 719–724. [Uma revisão de descobertas e desafios da obtenção de uma visão de genoma completo em câncer.]  
 Tavasoe SF, Alarcón C, Oskarsson T et al. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147–152.  
 Weir BA, Woo MS, Getz G et al. (2007) Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450, 893–898. [A identificação de variações do número de cópias em 371 tumores.]

### Revelando a evolução em múltiplos estágios de um tumor

Fodde R, Smits R & Clevers H (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67. [Uma visão detalhada da função APC e da surpreendente regularidade dos tipos de mutações encontrados.]  
 Kinzler KW & Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170. [Uma revisão de seus importantes trabalhos pioneiros a respeito do desenvolvimento de câncer colorretal e uma introdução da hipótese dos *gatekeeper* (guardiões).]

### Integrando os dados: câncer como biologia celular

Hahn WC & Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 331–340. [Uma tentativa de definir o mapa de rotas da carcinogênese.]  
 Nguyen DX & Massagué J (2007) Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat. Rev. Genet.* 8, 341–352. [Uma discussão detalhada de como e quando um tumor adquire potencial metastático.]  
 Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C et al. (2002) RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418, 934. [Mostra que mutações *RAS* e *BRAF* representam caminhos alternativos para alcançar um mesmo fim na tumorigênese.]  
 Smith G, Carey FA, Beattie J et al. (2002) Mutations in APC, Kirstenras, and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 9433–9438. [Esse estudo salienta a heterogeneidade dos eventos moleculares na evolução do câncer colorretal.]  
 Vogelstein B & Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789–799. [Uma boa visão geral das rotas no desenvolvimento de tumores.]