



BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS DO CÂNCER COLORRETAL

*Luis Alejandro Mendoza Samaniego
Professor: Paulo Worfel*

Resumo

O câncer colorretal é um dos cânceres mais proeminentes no planeta, além de estar entre os mais mortais. O prognóstico de um paciente está diretamente relacionado com o estágio em que é descoberta a doença, por isso, exames frequentes de triagem na população são essenciais. Entretanto, o padrão ouro de diagnóstico, a colonoscopia, tende a ser inacessível, para um grande espectro da população, e invasiva. Avanços em alternativas diagnósticas para câncer colorretal, como a pesquisa de biomarcadores em amostras de fácil coleta, podem ser alternativas com maior adesão entre a população. Decorrente da relevância dessa temática, o presente trabalho buscará identificar os biomarcadores epigenéticos do câncer colorretal, visando entender as principais alterações epigenéticas causadoras de câncer e seus possíveis usos clínicos. Para tanto, será realizada uma revisão de literatura em artigos publicados nas bases de dados Pubmed e Scielo. Os artigos escolhidos serão originais e de revisão, redigidos na língua inglesa e portuguesa, a partir de palavras-chave como epigenetic biomarkers e colorectal cancer. O período de pesquisa bibliográfica será de fevereiro a abril de 2024 e contará com trabalhos publicados nos últimos 10 anos. Este estudo visa analisar alterações epigenéticas que possam auxiliar clinicamente para a detecção, identificação do estágio e prognóstico do câncer, através de amostras de fácil coleta, como plasma e fezes. Assim, contribuindo para as chances de sobrevivência de um paciente.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Biomarcadores epigenéticos; Metilação do DNA; Modificação de histonas; RNA não codificante.

1 Introdução

O câncer colorretal (CCR) é o segundo maior causador de mortes relacionadas a câncer no mundo, além de ser um dos mais comuns. Em 2020 houve mais de 1.9 milhões de novos casos registrados e mais de 930 mil mortes foram estimadas mundialmente. Até o ano de 2040 se estima um aumento de 3.2 milhões de novos casos por ano, um aumento de 63%, e 1.6 milhões de mortes por ano (WHO, 2023).

O prognóstico do câncer colorretal está diretamente ligado ao estágio da doença, por isso pacientes em estágios iniciais tendem a ter maior chance de sobrevivência. Esta relação já pode ser vista em países de renda alta. A colonoscopia é o exame padrão ouro para identificação dos estágios iniciais do CCR, porém tendem a ser caras, invasivas e de maneira geral inacessíveis (WHO, 2023).

A análise de biomarcadores epigenéticos, permite a realização de triagem de maneira rápida, não invasiva e barata. Através de kits e amostras de fácil coleta como o plasma e fezes do paciente (JUNG, et al, 2020).

Um biomarcador de câncer é classificado como uma característica que pode ser usada como medida de identificação de risco de câncer, ocorrência de um câncer e até prognóstico de um



câncer. Estes biomarcadores, podendo ser moleculares, celulares e fisiológicos, são encontrados em tecidos ou fluidos corporais, e passam a ser produzidos por células cancerígenas ou por células normais como resposta ao câncer. A testagem da presença de biomarcadores específicos serve como indicativo de mudanças no DNA, RNA, proteínas ou outras biomoléculas, a identificação de certas alterações genéticas pode prover informação relevante para um diagnóstico de neoplasia, prognóstico e acompanhamento da mesma (SARHADI, et al, 2022).

Há diversas modificações epigenéticas de interesse nos estudos do câncer, para o CCR, as mais notáveis são a metilação do DNA, modificação de histonas e RNA não codificante, todas são diretamente relacionadas a patogenicidade do câncer colorretal. Levando em consideração que estes biomarcadores se apresentam de maneira inicial e frequente, junto com o avanço da tecnologia genômica, estes biomarcadores podem ser considerados como a próxima geração clínica de diagnóstico de pólipos de cólon e mais importante, cânceres em pacientes (OKUGAWA, et al, 2015).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Identificar os biomarcadores epigenéticos do câncer colorretal.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar os principais mecanismos de alteração epigenética causadores do câncer colorretal
Avaliar a relevância clínica da identificação de biomarcadores epigenéticos do câncer colorretal.

3 Fundamentação Teórica

3.1 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia que acomete o intestino grosso e/ou reto, e tem uma incidência aumentada ao longo dos últimos anos, além de ser a terceira neoplasia mais frequente no mundo. A ocorrência de neoplasias primárias como adenomas e adenocarcinomas ocorrem de maneira frequente no cólon. Assim como o cólon, pode acometer o ceco, cólon ascendente e transversal, todas seções do intestino grosso humano (SILVA e ERRANTE, 2016).

A maior parte dos CCR tem como início adenomas, que surgem a partir da alteração genética das nossas células normais da mucosa colônica, este processo pode levar cerca de 10 anos. A partir dos adenomas, pode surgir um pequeno pólipos, que progride para uma maior (maior



que 1cm), estes de maior tamanho são os que evoluem para uma displasia e câncer. O risco de CCR aumenta diretamente com a quantidade, histologia e tamanho dos pólipos (MALLMANN, et al, 2017).

O desenvolvimento do CCR em uma pessoa pode ser entrelaçado com diversos fatores, dentre eles há alguns que prevalecem entre a população. A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CCR, há uma ocorrência de aproximadamente 10% em pessoas abaixo de 50 anos, a partir dos 50 anos até os 74, é a faixa etária onde ocorrem a maioria dos cânceres, em torno de 59% dos indivíduos, os restantes 31% dos pacientes são pessoas acima de 74 anos. O sobrepeso e obesidade também aumentam as chances de desenvolvimento, já que com um nível aumentado de gordura há um conseqüente aumento da insulina, maior crescimento celular e uma inibição no processo de apoptose. Interligado com o sobrepeso está a inatividade física, esta é importante para a regulação de marcadores inflamatórios e o tempo de trânsito intestinal, essencial para a redução do período de contato de substâncias, que podem favorecer a carcinogênese, com a mucosa intestinal. Por último, o consumo excessivo de carnes vermelhas e álcool são fatores de risco para o surgimento de câncer colorretal (BRASIL, 2021).

Em países de renda alta, como Estados Unidos, tem se visto uma diminuição da mortalidade do CCR, isto se dá devido, principalmente, aos avanços no rastreamento da doença, fator de grande impacto para o seu prognóstico. Países do Leste Europeu, América do Sul e América Central, este mesmo índice continua em aumento, devido a recursos limitados e a uma pior infraestrutura do sistema de saúde (MALLMANN, et al, 2017).

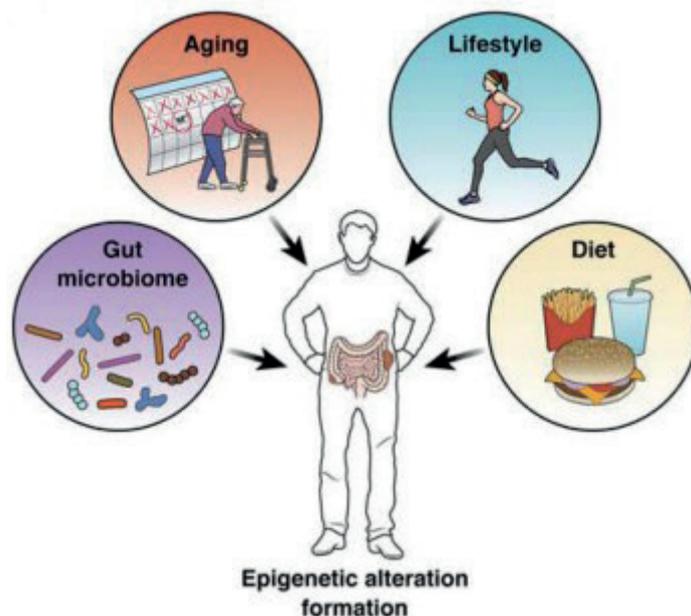
3.2 Epigenética

A tradução do nosso código genético para sequências de proteínas não depende apenas da sequência em si apresentada, há também um sistema regulador sofisticado que interage com fatores genéticos e ambientais. Este sistema compõe o que conhecemos como epigenética. Epigenética é formalmente definida como uma mudança herdável na expressão gênica ou estabilidade cromossomal por meio da utilização da metilação de DNA, modificação de histonas ou RNA não codificante, sem ocorrer uma mudança da sequência de DNA (LLANGO, et al, 2020).

Os mecanismos epigenéticos que ocorrem em nosso genoma, como metilação do DNA e modificação de histonas, são considerados essenciais para o desenvolvimento e a manutenção de padrões de expressão gênica. Estas variações epigenéticas apresentam propriedades e sequências padrões, ou seja, epigenoma, e são fatores determinantes para o destino celular e para sua atividade genética (LLANGO, et al, 2020).



Figura 1 - Fatores de influência para alterações epigenéticas



Fonte: GRADY, et al, 2021, p.30.

Variações epigenéticas causam mudanças na metilação do DNA ou modificação de histonas, o que não afeta a sequência de codificação do DNA. No entanto, afetam a estabilidade e estrutura do DNA, tendo um grande impacto para a carcinogênese. Essas mudanças epigenéticas, que ocorrem em células cancerígenas, tornam-se úteis como biomarcadores de câncer, devido que a metilação do DNA ocorre nos estágios iniciais da tumorigênese (SARHADI, et al, 2022).

Para o “National Institute of Health Biomarkers Definitions Working Group” um biomarcador é uma característica que pode ser mensurada, esta é indicativa de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas patogênicas a uma intervenção terapêutica. O programa Internacional de Segurança Química junto com a Organização Mundial da Saúde, acrescentam que é qualquer substância, estrutura ou processo que também possa ser mensurado e influencie ou prediga o desenlace de uma doença. De uma maneira mais ampla, também são considerados fatores como exposição não intencional a químicos e nutrientes (STRIMBU e TAVEL, 2010).

3.2.1 Metilação de DNA

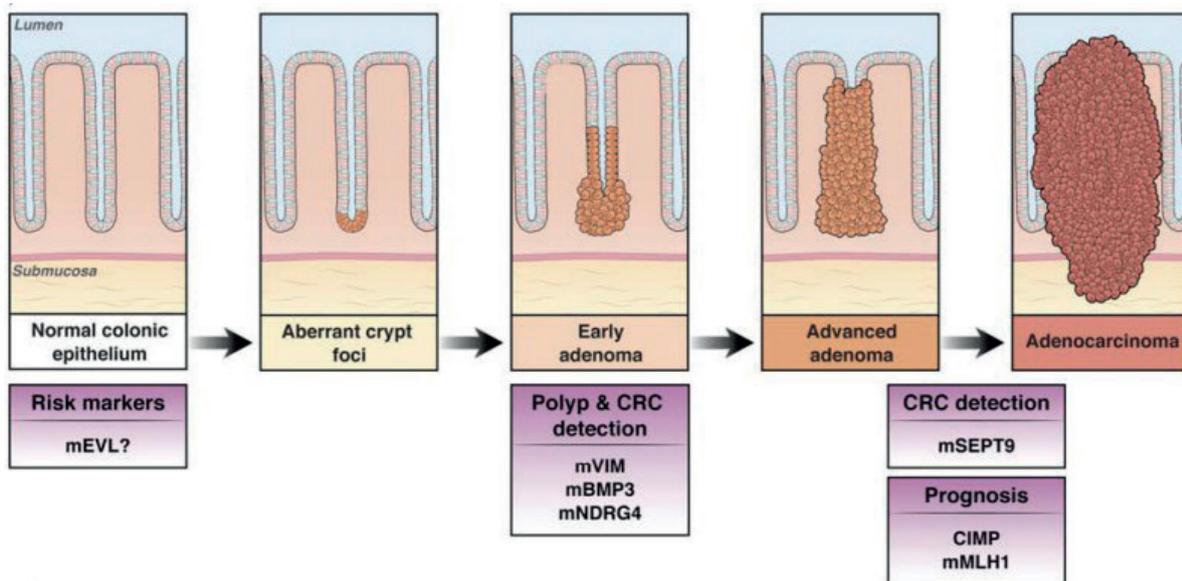
Metilação de DNA é uma das diversas modificações epigenéticas que regulam expressão gênica, em humanos, ocorre em citosinas, precedentes da guanina, chamados dinucleotídeos CpG. A maioria destes dinucleotídeos já são metilados no genoma humano, entretanto, há regiões ricas em sequências CpG, denominadas de ilhas CpG, elas tipicamente se encontram não metiladas em células normais. As ilhas CpG estão localizadas geralmente nas regiões promotoras de genes



supressores de tumores e têm um papel na regulação da expressão gênica e silenciamento genômico. Metilação do DNA é mediado pela enzima DNA metiltransferase, que através de ação catalítica adiciona um grupo metil a quinta posição do anel de citosina em dinucleotídeos CpG, estas enzimas podem ser vistas como encarregadas por manter padrões de metilação durante a replicação do DNA (OKUGAWA, et al, 2015).

A patogenicidade do CCR pode provir de diferentes caminhos, recentemente a alta frequência de casos de hipermetilação de DNA também foi identificada como um meio patogênico. Cânceres provenientes da disfunção epigenética frequente, a metilação do DNA, foram denominados como “CIMP”, do inglês “CpG island. methylator phenotype”. A transição de mucosa intestinal normal para pólipos adenomatosos é marcada tanto por fatores genéticos quanto epigenéticos, estes podem alterar rotas moleculares centrais. Quando ocorre a hipermetilação de certos genes (SLC5A8, ITGA4, SFRP2, PTCH1, entre outros), alguns destes têm papel no início de formação de adenomas do câncer colorretal. A identificação de genes metilados em pólipos de cólon levou ao uso como biomarcadores para a detecção precoce do câncer colorretal (OKUGAWA, et al, 2015).

Figura 2 - Progressão de epitélio normal a adenocarcinoma, com genes metilados associados a cada etapa.

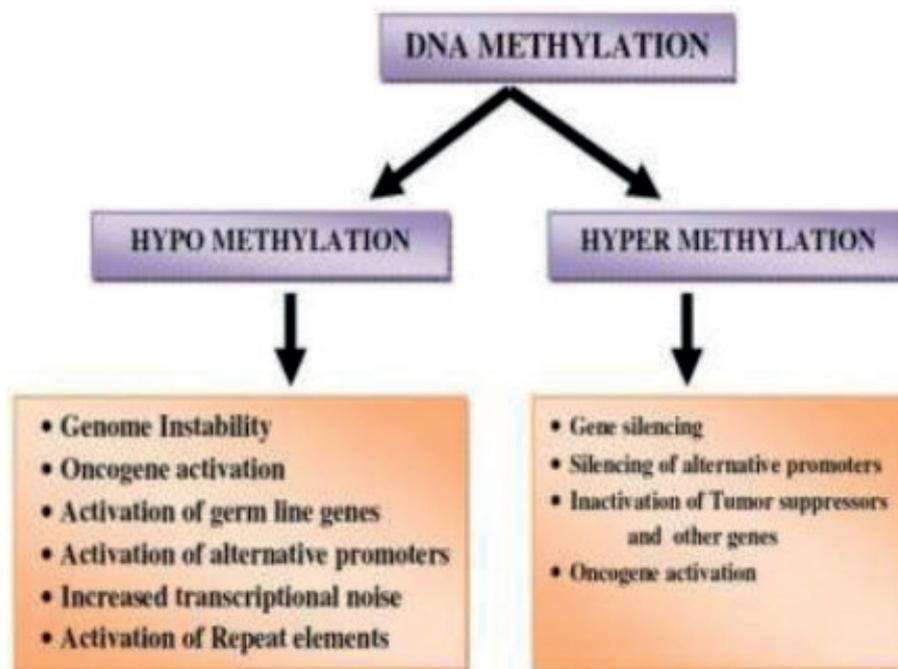


Fonte: GRADY, et al, 2021, p.33.

Em células cancerígenas, a hipometilação global do DNA foi identificada como a principal e primeira a surgir dentre as mudanças de metilação do DNA. A perda do metil no DNA potencialmente contribui para uma instabilidade genômica e o aumento de anomalias cromossômicas, ambos considerados fatores determinantes para a formação de câncer. Logo, com a redução ou exclusão do manutenção de metil do DNA, há uma maior chance de evolução de mutações, instabilidade genômica e indução de tumores (LLANGO, et al, 2020).



Figura 3: Metilação do DNA



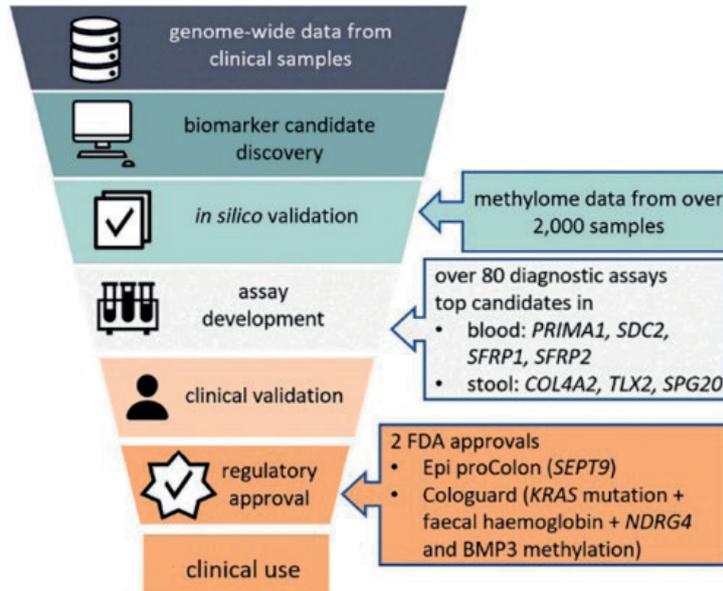
Fonte: LLANGO, et al, 2020, p. 1069.

Pesquisadores descobriram que pode ser detectado DNA, de células tumorais, de maneira livre na corrente sanguínea ou fezes do paciente, assim elaborando técnicas diagnósticas rápidas e não invasivas através da procura destes biomarcadores em amostras de sangue e fezes. A presença de septin 9 (SEPT9) metilado é o atual teste com maior sensibilidade para detecção do CCR, 90%, é feito através de amostra de plasma e exame de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (COPPEDÈ, et al, 2014).

SEPT9 é um gene que tem papel importante no controle do ciclo celular, fator que tem sido associado como supressor de tumores. Para obter a aprovação clínica do uso de SEPT9 metilado como biomarcador epigenético, foram feitos diversos testes com sujeitos assintomáticos. Ao longos dos anos de testes, tendo início em 2010, os valores de sensibilidade e especificidade tiveram uma tendência a aumentar, chegando em 2015, a especificidade do teste foi determinada em 96%, tornando-o, para a FDA, órgão público americano responsável por saúde pública, um método confiável para a triagem de CCR (MÜLLER e GYÓRFFY, 2022).



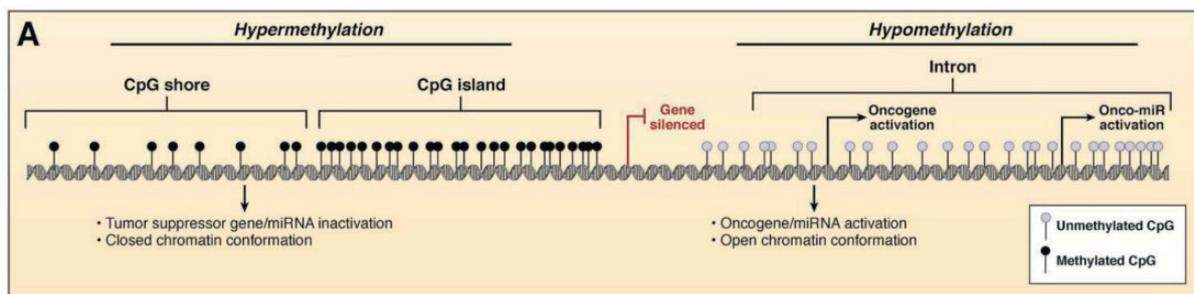
Figura 4 - Etapas para validação de um gene como biomarcador de uso clínico



Fonte: MÜLLER e GYÓRFFY, 2022, p.2.

NDRG4 é um gene regulador e codificador de proteínas, ele tem um papel importante na proliferação celular, apoptose e diferenciação celular, ele tem sido associado com diversos cânceres. No CCR foi observado seu papel como um supressor de tumor, assim como o gene BMP3, que, desde 2005, tem sido investigado e descrito também como um candidato a supressor de tumor de CCR. Em amostras fecais, a presença dos genes NDRG4 e BMP3 metilados, foram aprovados como indicativos de serem responsáveis por regulações epigenéticas no CCR. Após investigação mais extensa foi encontrada uma sensibilidade de 85% e especificidade de 90% para a triagem de pacientes com CCR e também pacientes com exame de colonoscopia negativa (MÜLLER e GYÓRFFY, 2022).

Figura 5 - Hiper/hipo metilação em célula cancerígena



Fonte: OKUGAWA, et al, 2015, p. 42.



3.2.2 Modificação de histonas

O nosso DNA, quando não está sendo transcrito, se encontra envolto de histonas, elas consistem em octâmeros de proteínas em pares. As quatro proteínas são: H2A, H2B, H3 e H4. Esta envoltura do DNA, em histonas, formam os nucleossomos que quando ainda mais compactadas e em adição com outras proteínas nucleares formam a cromatina (JUNG, et al, 2020).

As histonas possuem longas caudas que sobressaem dos nucleossomos, estas salientes são suscetíveis a modificações, das várias modificações, tem se tido mais interesse em duas, a acetilação e metilação de histona. Isto devido ao seu papel na expressão gênica (QIN, et al, 2019).

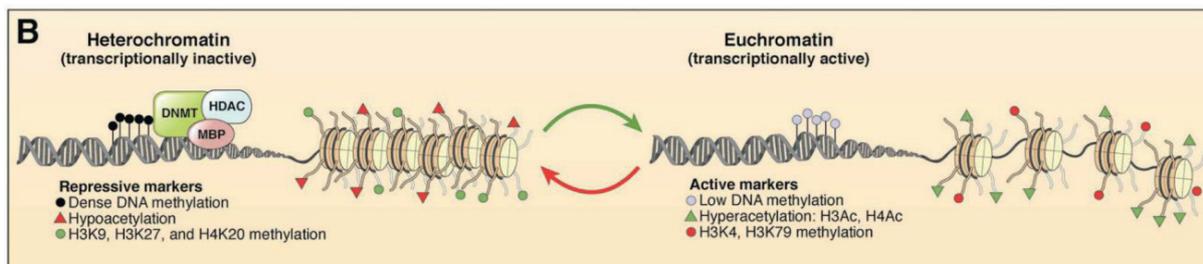
A acetilação de histonas é catalisada pelas “HATs” e “HDACs” do inglês “histone acetyltransferases” e “histone deacetylases” respectivamente, esta mudança de acetilação das caudas das histonas faz com que ocorra uma mudança na carga elétrica das mesmas, neutralizando a sua carga, com isto a interação eletrostática entre DNA e histona é enfraquecida, assim modificando o estado de compactação de cromatina. No caso de uma hiperacetilação das histonas associadas com proto-oncogenes, será ativada uma expressão genética exacerbada. No outro lado do espectro, a hipoacetilação de histonas relacionadas com genes supressores de tumores, irá causar um silenciamento dos genes devido a sua compactação. Ao ponto de vista da formação de neoplasias, ambos cenários são importantes para entender o desenvolvimento e progressão do câncer (JUNG, et al, 2020).

A metilação de histonas, assim como a acetilação, é mediada por duas enzimas, as “HMTs” e “HDMTs” do inglês “histone methyltransferases” e “histone demethyltransferases” respectivamente. Neste processo ocorre a transferência de um grupo metil ao resíduo das caudas de arginina ou lisina das histonas. A lisina pode ser monometilada, dimetilada ou trimetilada, e este processo ocorre principalmente na histona H3 e H4, tornando-a mais estável na regulação de expressão gênica (QIN, et al, 2019).

Modificações na estrutura tridimensional dos nucleossomos causam um efeito no controle de transcrição de genes, já que cria regiões inativas, ou seja, compactadas, também sítios ativos, regiões não compactadas. Um exemplo é a dimetilação e trimetilação da histona H3 lisina 4, que permitem um estado transcricional ativo, já a trimetilação da histona H3 lisina 9 e 27, são associadas com uma transcrição inativa e como possíveis biomarcadores. Devido a limitações técnicas, não é tão fácil relacionar formação de neoplasias com os processos de modificações de histonas, todavia, é provável que esta desregulação altere o padrão de expressão de genes no CCR (OKUGAWA, et al, 2015).



Figura 6 - Modificações de histona em célula cancerígena



Fonte: OKUGAWA, et al, 2015, p. 42.

3.2.3 RNA não codificante

Os RNAs não codificantes funcionam como mediadores transcricionais, e mesmo que eles representam 98% do genoma não codificante de proteínas, ainda têm um importante papel na regulação de expressão gênica. Estes mediadores podem ter características tumorigênicas ou anti-tumorigênicas, desde sua descoberta tem sido classificados de acordo com seu tamanho e função (JUNG, et al, 2020)

O grupo com menor quantidade de nucleotídeos, os microRNAs (miRNAs), são fitas simples de RNA que têm chamado a atenção devido ao seu papel na formação de CCR. Este grupo de RNAs atua como um repressor pós-transcricional, é feita uma ligação complementar no sentido 3' de regiões não traduzidas no seu alvo de RNA mensageiro, por isso, eles controlam a tradução de menos de 60% de genes codificantes de proteína, isto inclui, os importantes processos tumorigênicos, como proliferação celular, diferenciação e apoptose (JUNG, et al, 2020).

Com mais evidência científica surgindo ao longo do tempo é fácil demonstrar o papel dos miRNAs na formação de câncer, também que há uma desregulação dos mesmos em casos estabelecidos de câncer. Com isto em mente, é entendido que miRNAs expressos de maneira exagerada, no câncer, podem funcionar como oncogenes, e em contraponto, miRNAs com atividade supressora de tumores podem ter um baixo nível de funcionamento (LLANGO, et al, 2020).

Estudos mais recentes continuam apontando miRNAs em todos os pontos chave da formação do câncer e ainda mais importante, a vinculação de miRNAs existentes a diferentes cânceres. Na posição cromossomal 13q14.3 os miRNAs miR-15 e miR-16 foram encontrados majoritariamente inexistentes em casos de leucemia linfocítica crônica, também hipermetilação do miR-9 é aparente em diversos casos de carcinoma de cólon, pescoço e pulmões. A família miR-148/152 têm sido estudados como potenciais oncogenes e também supressores de tumores, em amostras de plasma de pacientes com mieloma múltiplo o aumento de miR-148a tem sido significado de uma baixa probabilidade de sobrevivência (LLANGO, et al, 2020).

O potencial de miRNAs como biomarcadores clínicos se dá devido ao seu pequeno tamanho, quantidade limitada, em comparação a genes codificantes de proteínas, e pela sua estabilidade



em diversos tipos de amostra, como sangue, fezes e tecidos. Com isso, a quantidade de estudos visando entender o uso de miRNAs como biomarcadores só tem aumentado exponencialmente (JUNG, et al, 2020).

Infelizmente, para poder considerar os miRNAs conhecidos como possíveis biomarcadores aptos para a detecção precoce, evolução ou prognóstico de CCR, é necessária mais pesquisa sobre o assunto, já que ainda é um procedimento laboratorial relativamente complexo e ainda nenhum obteve resultados chave para adaptação ao cenário clínico (ISLAM, et al, 2023; JUNG, et al, 2020).

Relevância Clínica

No Brasil, o CCR é ainda o terceiro câncer mais diagnosticado. Em comparação com outros países mais desenvolvidos do mundo, como Estados Unidos e Canadá, o índice de tumores por CCR no Brasil e América do Sul só teve aumento desde os últimos anos, principalmente em grandes centros urbanos com maior densidade populacional. Mais de 70% das mortes por CCR ocorrem por motivos de falta de estrutura e limitação de recursos para prevenção, diagnóstico e tratamento, no Brasil, 55-70% dos pacientes são diagnosticados em um estágio avançado da doença, o que contribui diretamente para um pior prognóstico (KUPPER, et al, 2023).

O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos estima que se todos os indivíduos acima de 50 anos passassem por triagem recorrente, seria possível diminuir o total de mortes por CCR em 60%. Também, triagem recorrente pode reduzir a mortalidade de um paciente entre 15-33% e reduzir a incidência de pólipos em 20% quando examinados através de colonoscopia. A colonoscopia atualmente é considerado o meio mais efetivo como triagem para o CCR, entretanto, no Brasil, o número de colonoscopias realizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) entre 2010 e 2018, não tem conseguido acompanhar o número de diagnósticos de CCR com o crescimento populacional atual. Outro fator é a baixa adesão de triagem em populações de baixa renda e que não possuem planos de saúde. Tais dados enfatizam a necessidade de implementar novas técnicas de triagem em indivíduos assintomáticos, além da disponibilidade e aprimoramento de colonoscopias (KUPPER, et al, 2023).

4 Material e Método

Para esta revisão será realizada uma pesquisa em artigos publicados na base de dados Pubmed e Scielo. Serão escolhidos artigos originais e de revisão em inglês e português, a partir da busca por meio das seguintes palavras-chave: Epigenetic biomarkers e Colorectal cancer, fazendo uma interligação entre ambos. O período de pesquisa bibliográfica será de fevereiro a abril de 2024 e a revisão contará com trabalhos dos últimos 10 anos.



Referências

- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Detecção Precoce do Câncer. Rio de Janeiro, RJ. 2021.
- COPPEDÈ, F.; LOPOMO, A.; SPISNI, R.; MIGLIORE, L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. V.20. 28 jan. 2014.
- GRADY, W. M.; YU, M.; MARKOWITZ, S. D. Epigenetic alterations in the gastrointestinal tract: Current and emerging use for biomarkers of cancer. *Gastroenterology*. Fev.2021
- ISLAM, M. S.; GOPALAN, V.; LAM, A. K.; SHIDDIKY, M. J. A. Current advances in detecting genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer. *Biosensors and Bioelectronics*. 19 ago. 2023.
- JUNG, G.; HERNANDEZ, E.I.; MOREIRA, L; BALAGUER, F.; GOEL, A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Fev. 2020.
- KUPPER, B. E. C.; FERREIRA, F. O.; NAKAGAWA, W. T.; CALSAVARA, V. F.; CHULAM, T. C.; LOPES, A.; AGUIAR-JUNIOR, S. COLORECTAL CANCER: ASSOCIATION BETWEEN SOCIODEMOGRAPHIC VARIABLES AND THE ADHERENCE TO CANCER SCREENING. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. Jan. 2023.
- LLANGO, S.; PAITAL, B.; JAYACHANDRAN, P.; RAGHUNATHAN, P.;
- NIRMALADEVI, R. Epigenetics alterations in cancer. *Frontiers in bioscience*. Mar. 2020.
- MALLMANN, G.D.P.; CECCON, L.; FELIX, R. P.; DARGÉL, V. A.; FILLMANN, L.S. Câncer colorretal / Colorectal cancer. *Acta méd*. 2017.
- MÜLLER, D.; GYÓRFFY, B. DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. *BBA Reviews on cancer*. 17 mar. 2022.
- SARHADI, V.K. e ARMENGOL, G. Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomelecules*. 23 jul. 2022.
- SILVA, M; ERRANTE, P.R. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*. v. 13. N. 33. out./dez. 2016.
- STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers?. *Curr opin HIV AIDS*. Nov. 2010
- OKUGAWA, Y.; GRADY, W.M.; GOEL, A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. Out. 2015.
- QIN, J.; WEN, B.; LIANG, Y.; YU, W.; LI, H. Histone modifications in and their Role in Colorectal Cancer (Review). *Pathology & Oncology Research*. 4 maio 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Colorectal cancer. 11 jul. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>. Acesso em: 12 set. 2023.