

# BIOLOGIA MOLECULAR

## Aula 7

Prof<sup>a</sup> Inês Rodrigues

2015/16  
2<sup>o</sup> Semestre

**CANCRO**

# O Que é o Cancro:

Neoplasia (*do grego: novo crescimento*) maligna.

Há um grupo de células se comporta de uma maneira diferente em relação a células normais.

As células cancerígenas dividem-se descontroladamente o que leva ao desenvolvimento do cancro.

Podem resultar num tumor na maior parte dos casos.

Podem provocar a patologia através da sua presença na circulação tanto sanguínea como linfática

# O Que é o Cancro:

Cancro provocado por tumores em órgãos específicos:

- Lipossarcoma: adipócitos
- Fibrossarcoma: fibrócitos
- Rabdomiossarcoma: músculo esquelético
- Leiomiossarcoma: músculo liso
- Carcinomas: células epiteliais
- Adenocarcinomas: células epiteliais com morfologia glandular
- Carcinomas epidermóides: células epiteliais escamosas
- Carcinoma hepatocelular: células epiteliais renais
- Linfomas: órgãos linfóides
- Leucemias: medula óssea
- Teratoma: células germinais
- Seminoma: células do testículo
- Carcinoides: células neuroendocrinas
- Hemangiossacromas: vasos sanguíneos
- Linfagiosacromas: vasos linfáticos
- Colangiossacromas: vasos biliares

# O Que é o Cancro:

## Hiperplasia:

(aumento do tamanho de um órgão ou tecido)

## **Tumor Maligno**

- Crescimento descontrolado (divisões acima dos limites normais)
- Invasão (invasão e destruição dos tecidos adjacentes)
- Metástases (difusão a outras partes do organismo através da linfa ou do sangue)

## **Tumor benigno:**

- Divisões controladas, dentro dos limites
- Não há invasão nem metástases

# O Que é o Cancro:

## Tumor Maligno vs. Tumor Benigno

	<b>Tumor maligno</b>	<b>Tumor benigno</b>
Velocidade de crescimento	Rápido	Lento
Tipo de crescimento	Invasão de tecidos adjacentes	Expande-se no tecido onde se encontra
Difusão	Metástases	Não se difunde pelo organismo
Diferenciação celular	Pobre	Normal

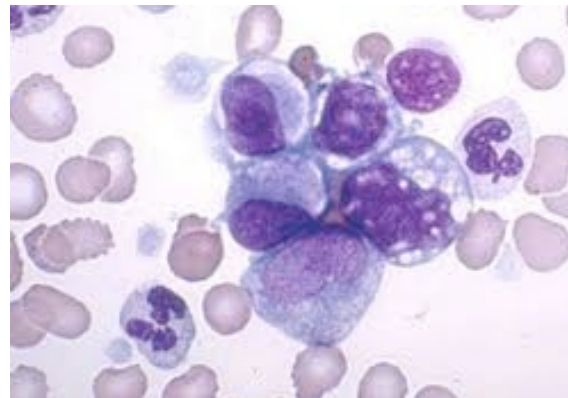
# O Que é o Cancro:

A maioria dos cancros forma um tumor, no entanto podem existir sem a presença de tumor:

## Displásia:

- Alterações no tamanho na forma e na organização das células num tecido
- Alterações no comportamento em relação a células normais
- As células cancerígenas têm características diferentes das células normais, o que as permite identificar ao microscópio.

Exemplo: Leucemia mielóide crónica



# Células cancerígenas

## Características estruturais:

- Não se dividem necessariamente mais rápido que as células normais, muitas vezes o problema está numa diminuição da apoptose (morte celular), o que aumenta significativamente a rapidez de crescimento de um tumor.
- Não respondem a sinais de adesão celular (perda de inibição por contacto).
- Isto leva à produção de uma massa desorganizada onde as células podem ter extensões.
- Podem produzir *angiogenina*, uma proteína potenciadora da formação de novos vasos sanguíneos.
- São capazes de se difundir pelo organismo através de metástases

# Células cancerígenas

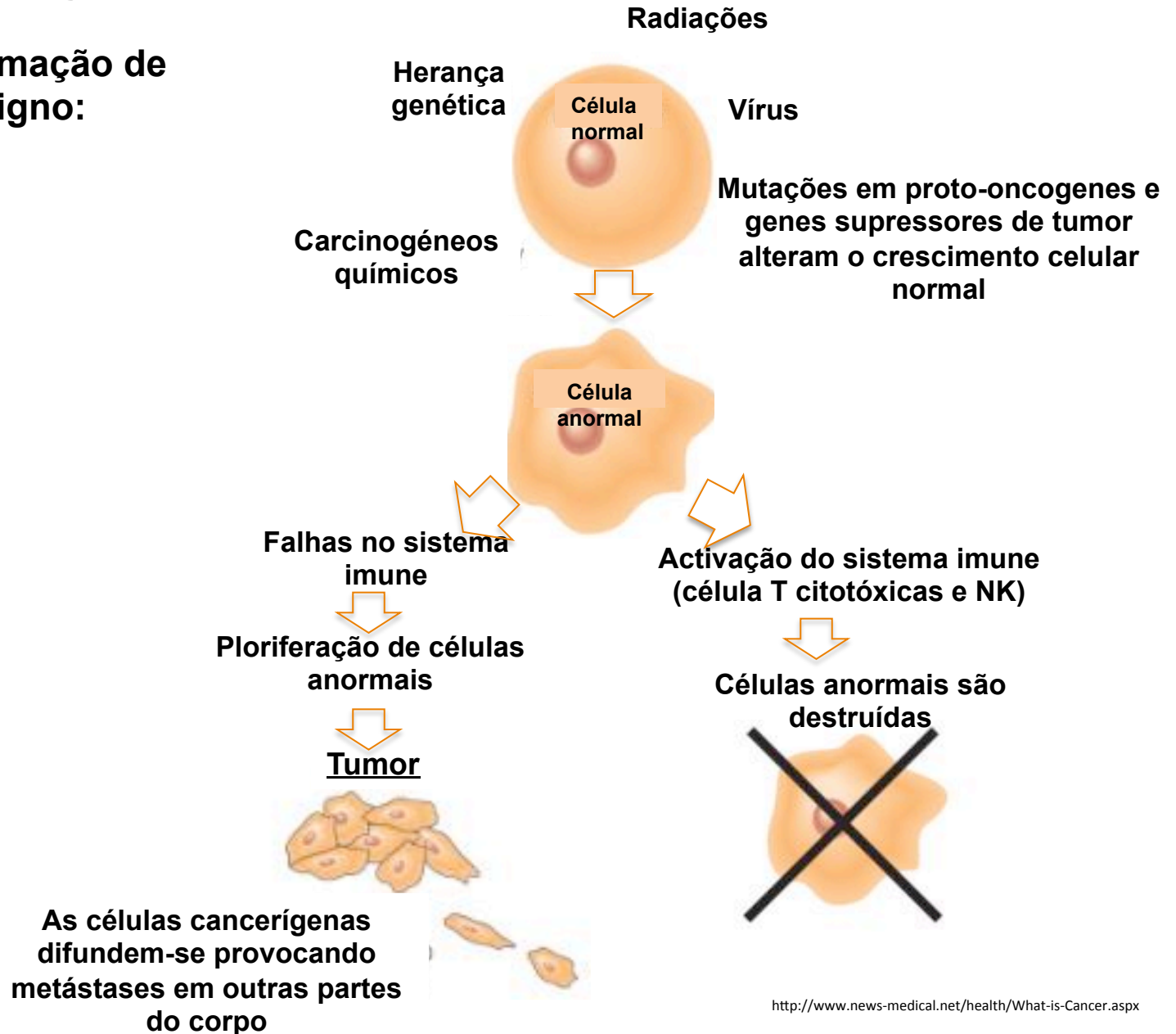
## Metástases:



1. As células cancerígenas podem desagregar-se do seu tecido original.
2. Estas células metastáticas aderem-se às paredes dos vasos sanguíneos ou linfáticos
3. Uma vez em contacto com a parede dos vasos, estas células secretam enzimas para romper a parede dos vasos e entrar na circulação.
4. Uma vez em circulação estas células viajam até outras partes do organismo
5. Saem da circulação sanguínea da mesma forma que entram e invadem outros tecidos

# Células cancerígenas

Causas da formação de um tumor maligno:



# Causas do cancro:

Quase todos os cancros são provocados por anormalidades no material genético das células transformadas.

Estas anormalidades são derivadas de diversos carcinogéneos como tabaco, produtos químicos, agentes infecciosos, factores ambientais, hábitos de alimentação, etc.

## Erros a nível celular:

- Erros na replicação do DNA
- Deterioração da cadeia de DNA
- Mutações genéticas herdadas
- Mutações genéticas adquiridas
- Erros epigenéticos
- Erros ao nível da transcrição de microRNAs



## Desregulação:

- 1. Apoptose**
- 2. Ciclo celular**

# Apoptose

# Apoptose

- É um processo de morte celular programada
- A célula é alvo de processos bioquímicos que determinam o seu destino final
- Só acontece em organismos multicelulares
- A membrana nunca se rompe, pelo que não há invasão do espaço extracelular com restos celulares
- É um processo que ocorre numa célula individual, independentemente do tecido em que se encontre

## **Apoptose função biológica:**

- Controla o número de células num organismo
- É essencial ao desenvolvimento, morfogénese e homeostase
- Elimina as células danificadas num tecido sem afectar as células vizinhas
- É um processo altamente regulado por cascatas de sinalização
- Encontra-se em equilíbrio com a mitose (ciclo celular) em tecidos adultos  
sãos

## **Apoptose função biológica:**

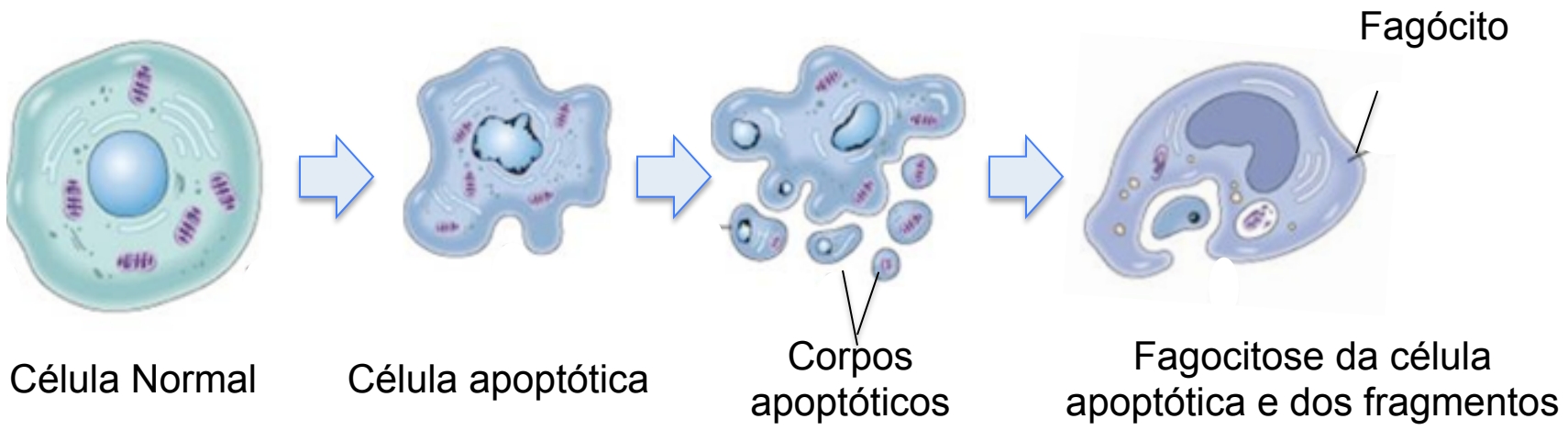
- É bastante importante na supressão de um tumor
- Quando activado a tempo, este processo pode eliminar uma célula potencialmente cancerígena

O equilíbrio entre o crescimento celular, a diferenciação e a apoptose afecta o número de células no corpo

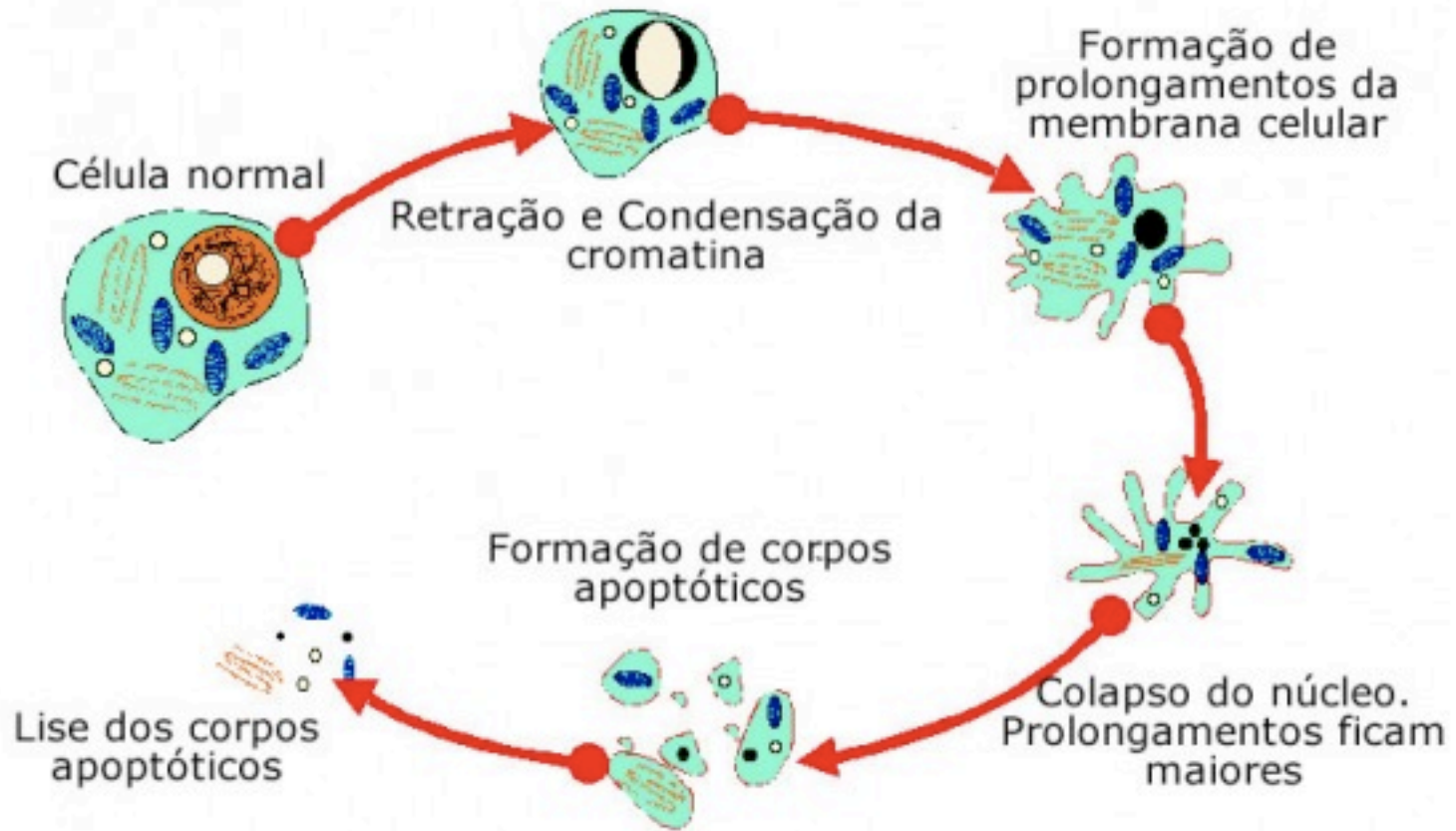
A regulação aberrante destes processos leva ao desenvolvimento de tumores

# APOPTOSE

Morte celular programada



# APOPTOSE

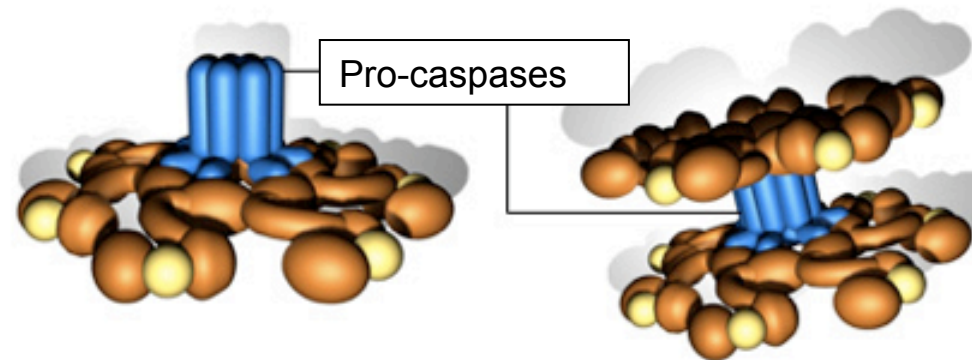
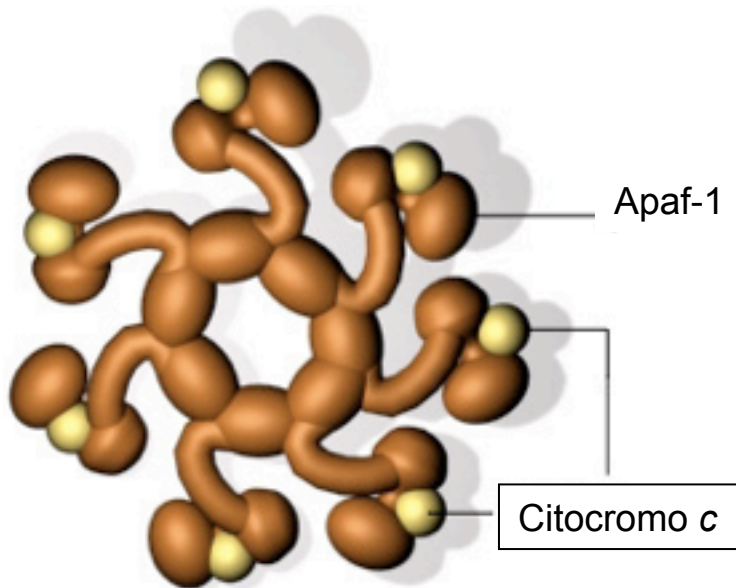


# Apoptose

- O material genético é degradado, o que leva à condensação em glóbulos da cromatina
- A membrana celular limita estes glóbulos levando à produção de corpos apoptóticos
- A célula e os corpos apoptóticos são captados por células fagocíticas, as quais detectam na superfície da membrana celular moléculas de **fosfatil-serina**
- Estas moléculas encontram-se na parte interna da membrana em células normais, quando a célula entra num processo apoptótico, estas moléculas são translocadas para a parte extra celular da membrana plasmática

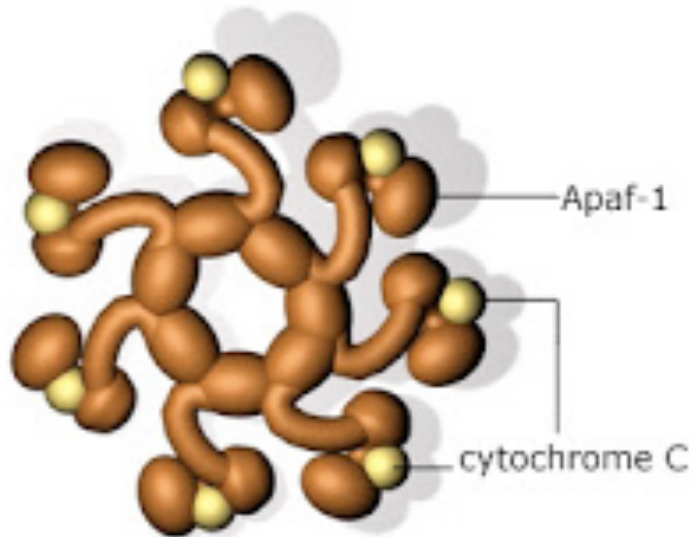
# Apoptose

- As mitocôndrias são preservadas até ao final do processo.
- Desempenham um papel determinante neste processo, uma vez que promovem a libertação de proteínas pro-apotóticas que constituem o **apoptossoma**:

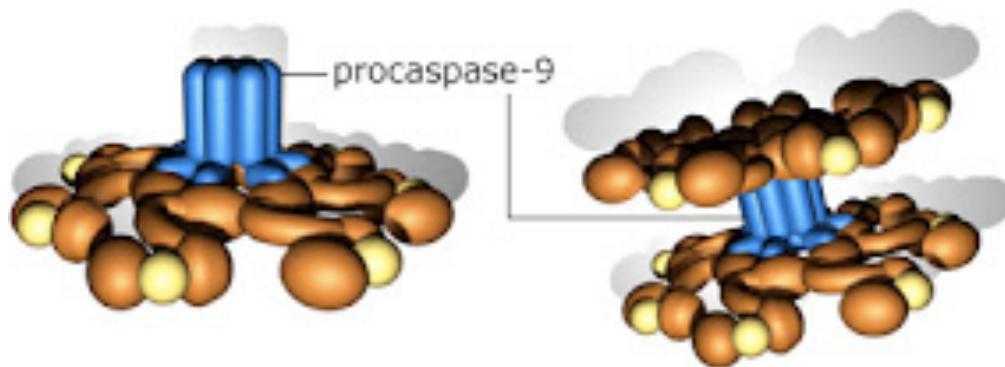


**Apoptossoma**

## First stage of apoptosome formation



Recruitment of  
procaspase-9



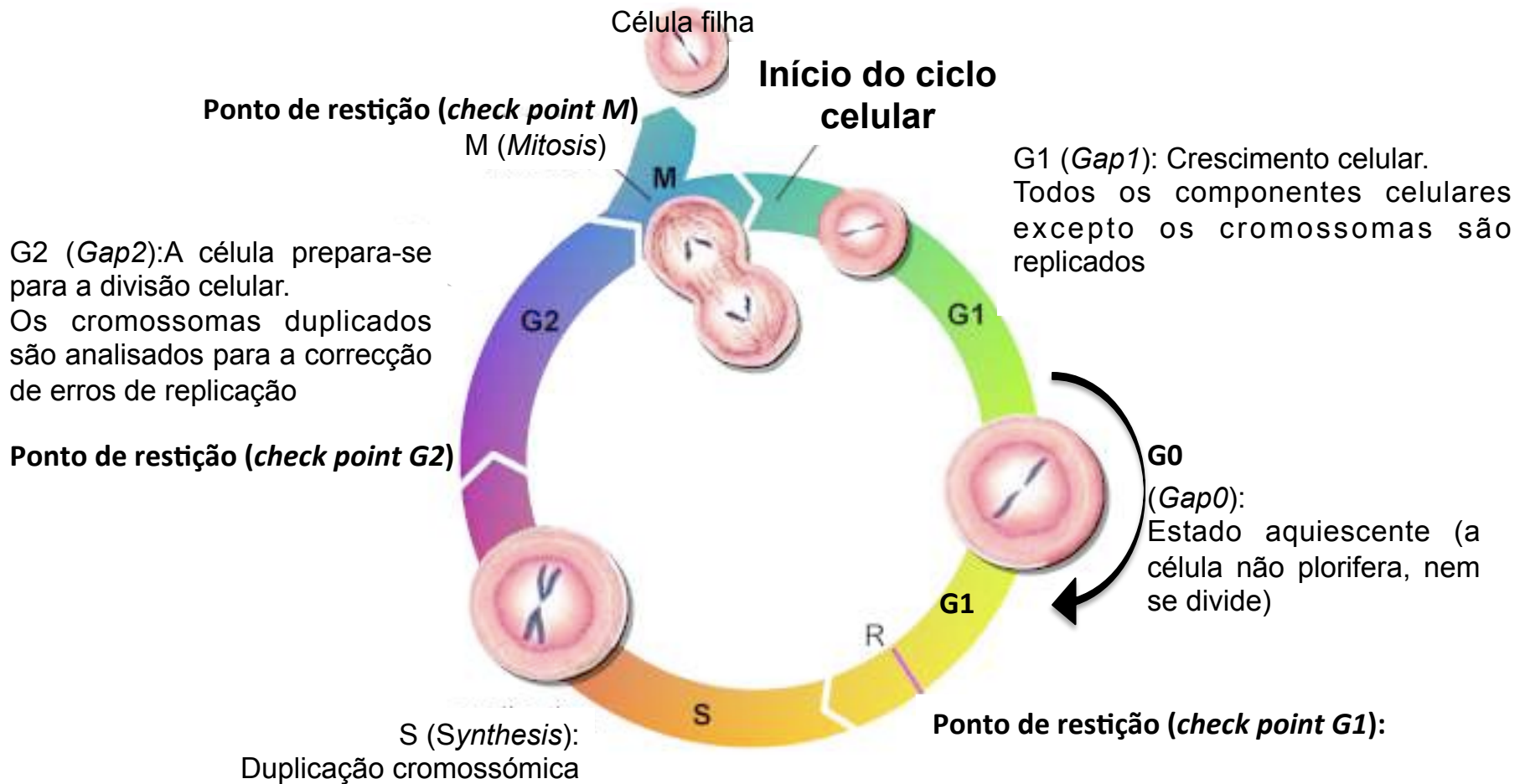
Caspase Activation

## Caspases

- São proteases com base de cisteína (cysteine-aspartic-acid-protease)
- São inicialmente sintetizadas como *pró-caspases* inativas
- O apoptossoma é regulado pelo citocromo C e pela família de proteínas bcl-2 que ativam a caspase-9
- Uma vez que a caspase-9 é ativada a célula verifica se é mesmo necessário a apoptose

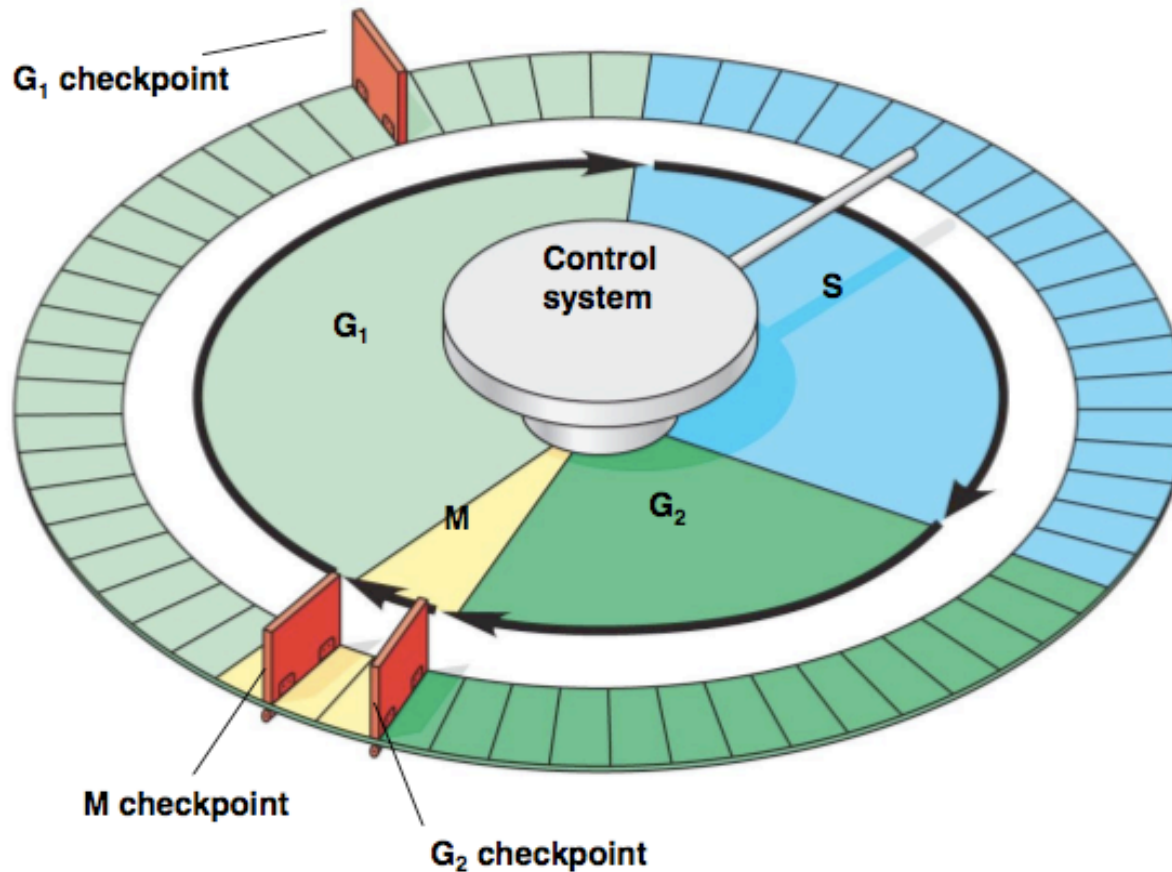
# **Ciclo Celular**

# Ciclo celular



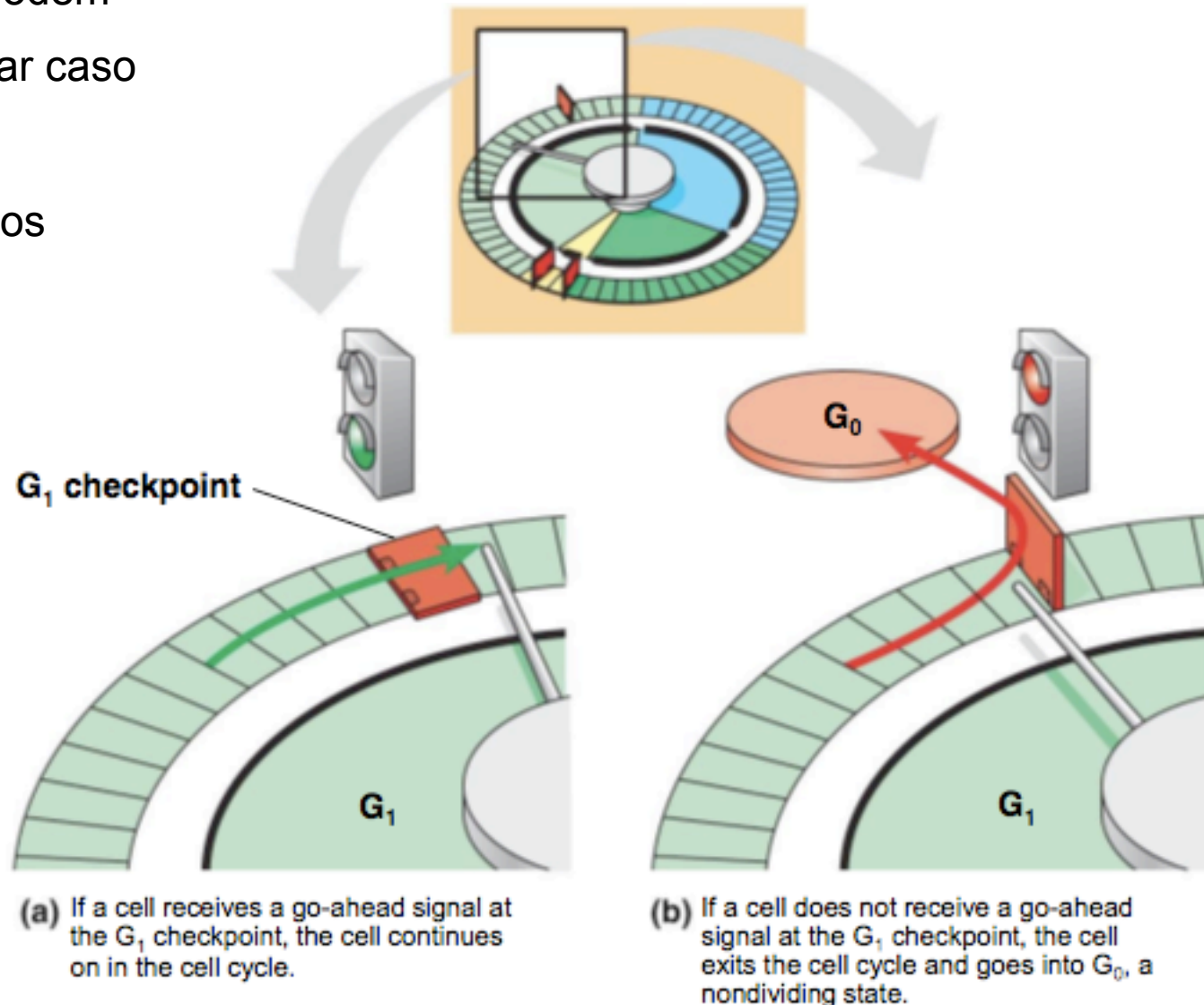
# Ciclo celular

A sequencia de acontecimentos do ciclo celular funciona como uma especie de relógio, com sitios de controlo: *check points*



# Ciclo celular

Os check points podem parár o ciclo celular caso existam sinais de regulação negativos



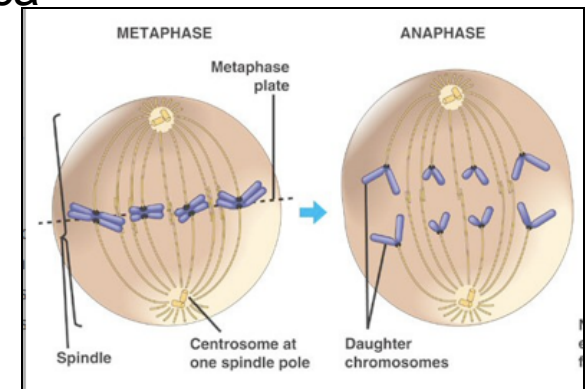
# Ciclo celular

Pontos de Restrição/controlo: *Check Points*

- **G1 check point:** Pára o ciclo celular quando detecta DNA danificado, impedindo a sua síntese na fase S

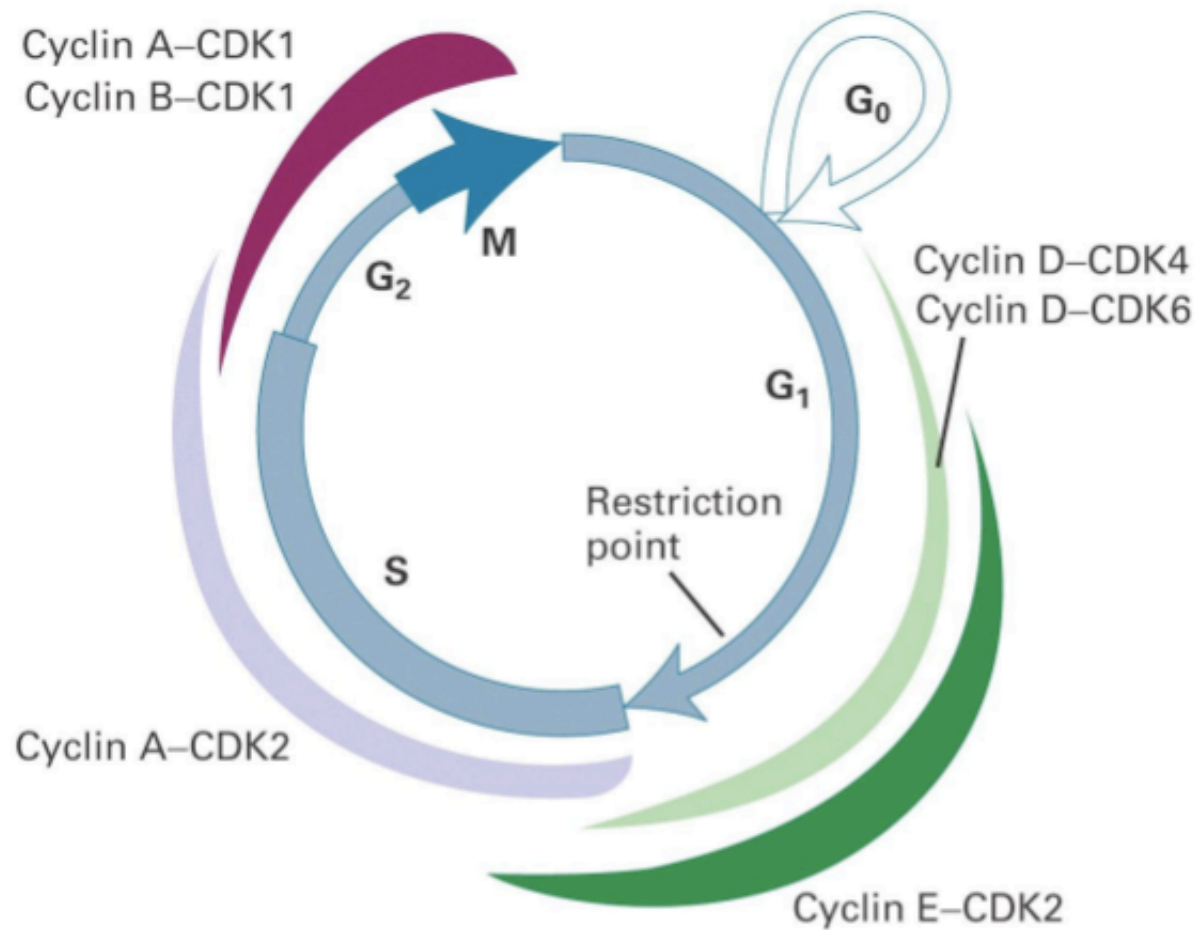
- **G2 check point:** Pára o ciclo celular em resposta a DNA danificado ou não replicado, assegurando desta forma que a fase S é devidamente concluída

- **M check point:** Pára o ciclo celular quando são detectados erros na mitose: Problemas na segregação cromossómica



# Ciclo celular

A passagem da célula pelas várias fases do ciclo celular é coordenada e regulada fundamentalmente pelo complexo **ciclina-quinase**:



# Ciclo celular

As ciclinas asseguram que o ciclo celular tenha um só sentido, sendo cada fase do ciclo irreversível.

- Ciclina D: É o motor de arranque do ciclo celular. Esta proteína é alvo (*downstream target*) de factores de crescimento e proliferação celular. Assegura a progressão do ciclo até ao final da fase G1, onde ativa a ciclina E, depois do primeiro *check point* (G1).
- Ciclina E: assegura a transição da célula para a fase S.

# Ciclo celular

As ciclinas asseguram que o ciclo celular tenha um só sentido, sendo cada fase do ciclo irreversível.

- Ciclina A: Inicia a sua acção na fase S e é importante para a progressão e passagem para a fase G2.
- Ciclina A+B: Assegura a progressão da fase G2 e a passagem para o *M-check point*.

# Desregulação do ciclo celular e da apoptose → Cancro

mutações em genes específicos

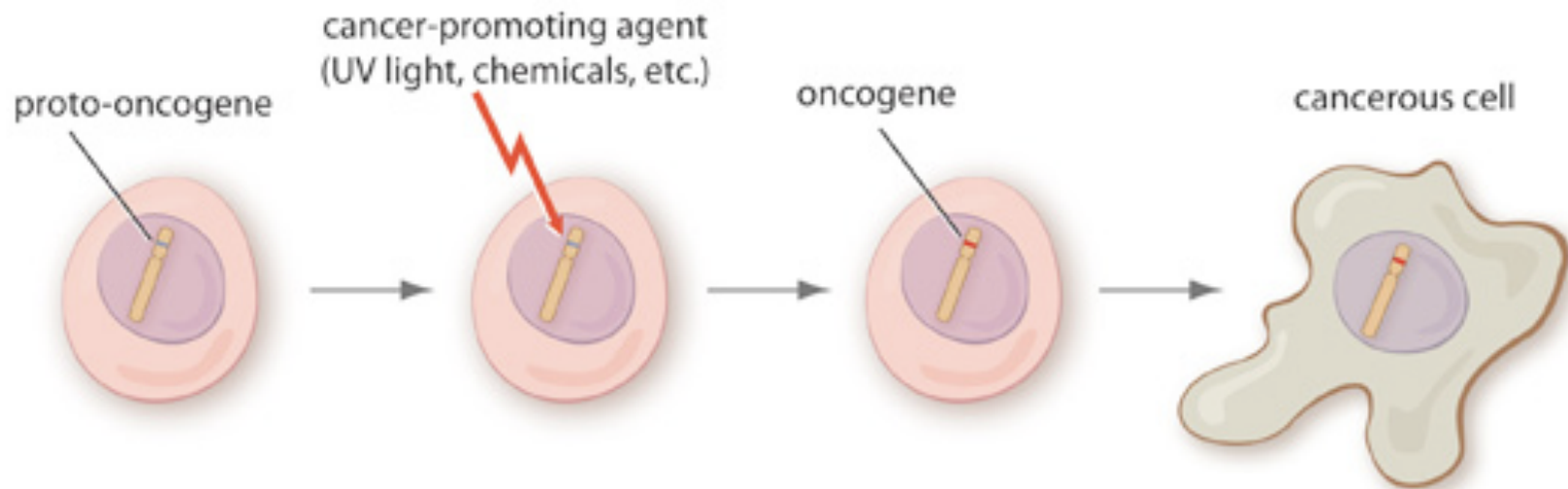
Tipo de gene	Função normal	Função mutada	Tipos de proteínas
<b>Oncogene</b>	Promove a divisão celular	Promove a divisão celular independentemente da sua fase do ciclo celular ou das suas características	Factores de crescimento
<b>Gene supressor de tumor</b>	Activam a apoptose	Falha na supressão da divisão celular	Moléculas envolvidas nos processos de <i>check point</i> durante o ciclo celular
<b>Genes envolvidos na reparação de DNA mutado</b>	Repara mutações no DNA	Falhas na reparação de mutações no DNA	Enzimas de reparação de DNA mutado

# **Oncogenes**

**Causas do cancro**

## Proto-oncogenes:

- Em células normais, estão envolvidos na estimulação da divisão celular
- Promovem a divisão celular e a proliferação celular e inibem a apoptose
- Quando estão mutados estes genes passam a chamar-se Oncogenes
- O ciclo celular fica comprometido



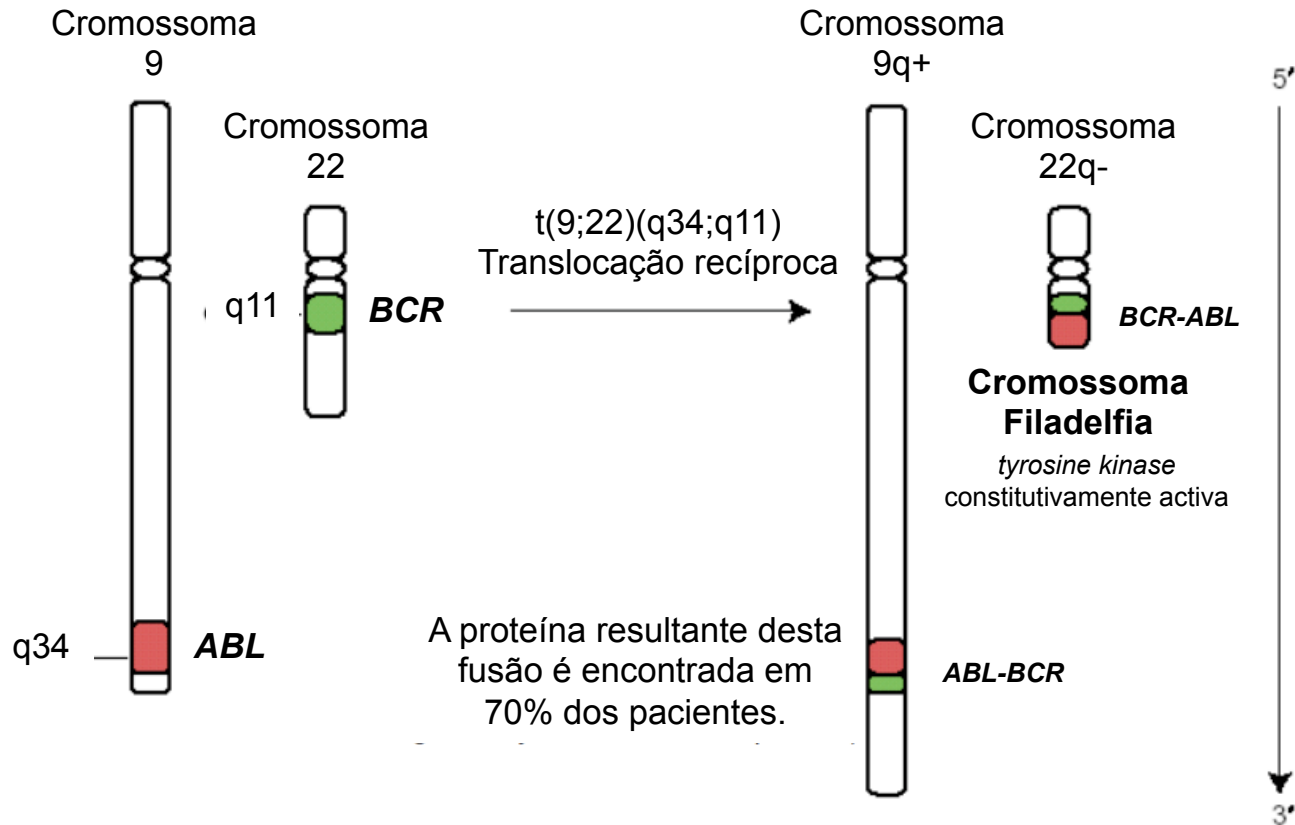
# Mutações em Proto-oncogenes

Proto-oncogene mutado = **Oncogene**:

- A proteína resultante é produzida em maiores quantidades
- A sua actividade encontra-se aumentada
- A proteína mutante actua de uma **forma dominante**, no organismo
- Uma mutação num único alelo é suficiente para haver um efeito na célula

# Oncogenes: exemplo

## Cromossoma *Philadelphia* (BCR-ABL)



Leucemia Mielóide crónica (LMC)

t(9;22)(q34;q11)

Cromossoma Filadélfia (*Ph*):

95% dos casos de leucemia mieloide crónica;

30% em adultos e 10% em crianças com leucemia linfoblástica aguda

Ocasionalmente em casos de leucemia mieloide aguda

## Oncogenes: exemplo

## Cromossoma *Philadelphia* (BCR-ABL)

Esta translocação cromossômica produz um novo oncogene, *BCR-ABL*, que codifica para uma proteína de fusão *bcr-abl* (*bcr-abl fusion-protein*).

A estrutura/peso molecular desta proteína de fusão, depende do sitio exato da translocação, o qual produz um oncogene com menor ou maior comprimento da sua região codificante.

Proteína de fusão *bcr-abl* identificadas:

- p210kDa
- p185kDa
- p190 (isofoma de p185): também associada a leucemia linfoblástica aguda
- p230 (isofoma de p210): leucemia neutrófila crónica

## Oncogenes: exemplo

## Cromossoma *Philadelphia* (BCR-ABL)

O **Proto-oncogene ABL1** codifica um proteína citoplasmática e nuclear, a tirosina-quinase, implicada na regulação de:

Diferenciação celular; Adesão celular; Divisão celular e Resposta a situações de stress

- O **Oncogene BCR-ABL** codifica uma proteína tirosina-quinase constitutivamente ativa, ou seja, não necessita de ser ativada por outras proteínas de sinalização. Está permanentemente ativa

- É uma proteína de membrana, citoplasmática e nuclear

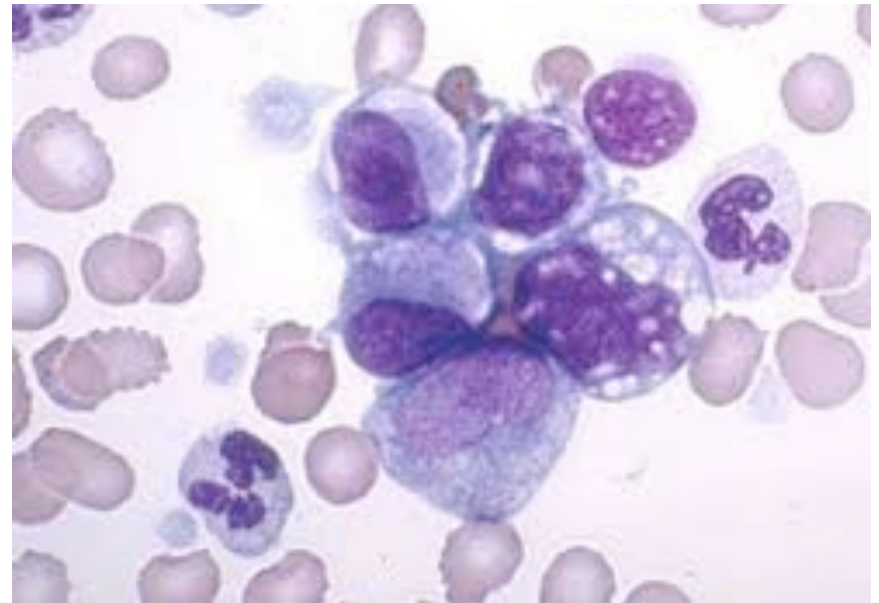
- Consegue ativar um grande número de proteínas e enzimas essenciais ao controlo do ciclo celular. Esta ativação descontrolada leva a um aumento da divisão celular

- BCR-ABL, também inibe a reparação do DNA, causando instabilidade genómica

# Oncogenes

## Cromossoma *Philadelphia* (BCR-ABL)

- Estas alterações de funções da proteína Abl1 afectam as células precursoras da linha mielóide, levando a um aumento desregulado da produção de células mieloides imaturas na medula óssea
- Este aumento traduz-se numa acumulação destas células na corrente sanguínea
- As células cancerígenas são normalmente células com grandes dimensões e de aparência imatura, podem provocar aglomerados na corrente sanguínea devido às suas dimensões e às características que apresentam.



# Oncogenes

## Proteínas *Ras*

- São pequenas *GTPases*
- Estão envolvidas na transdução de sinais celulares
- Regulam inúmeros processos relacionados com o crescimento e comportamento celular.
- Mutações no gene *Ras* encontram-se maioritariamente em pacientes de cancro de pulmão, pâncreas e cólon (30% dos casos)

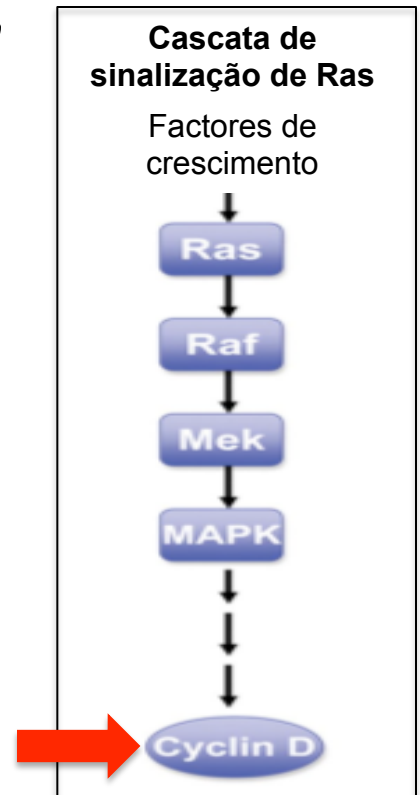
# Oncogenes

## Proteínas *Ras*

Esta proteína está envolvida na proliferação e sobrevivência celular.

Regula processos e rotas de sinalização *intra* e *extra* celular:

- Integridade do citoesqueleto
- Proliferação celular
- Adesão celular
- Apoptose
- Migração celular



# Oncogenes

## Proteínas *Ras*

Mutações pontuais (*SNP- single nucleotide polimorfism*) na sequência deste gene causam a tradução de uma proteína alterada.

A proteína *Ras* sofre um ganho de função (*gain of function mutations*) o leva a:

- Ativação constitutiva da proteína
- Proliferação e sobrevivência celular bastante aumentadas
- Diminuição da apoptose
- Contribui para processos de invasão e metástase.

# **Mutações em Genes supressores de tumor**

Causas do cancro

## **Genes supressores de tumor:**

- Têm a função de parar o crescimento e a divisão celular, de forma a evitar o desenvolvimento de cancro
- Protegem a célula quando o seu genoma se encontra danificado. A célula pode entrar num estado aquiescente ou em apoptose
- Podem reprimir a expressão de determinados oncogenes
- Podem ser silenciados por metilação de ADN (silenciamento epigenético)

## **Mutações em genes supressores de tumor:**

- Produzem proteínas alteradas com perda de função
- O efeito da mutação é recessivo uma vez que é necessária a mutação dos dois alelos ao mesmo tempo
- Podem existir devido a síndromes hereditárias ou aquisição de mutações somáticas (factores externos)

A ativação de oncogenes associada a uma diminuição na expressão de genes supressores de tumor contribui ao desenvolvimento de um tumor maligno.

# Genes supressores de tumor: exemplos

## TP53 gene

- Primeiro gene supressor de tumor identificado
- Envolvido em rotas de sinalização celular
- “Guardião do genoma” : desencadeia um mecanismo de supressão do crescimento celular descontrolado
- Este gene encontra-se mutado na **grande maioria dos cancros**

# Genes supressores de tumor:

## TP53 gene

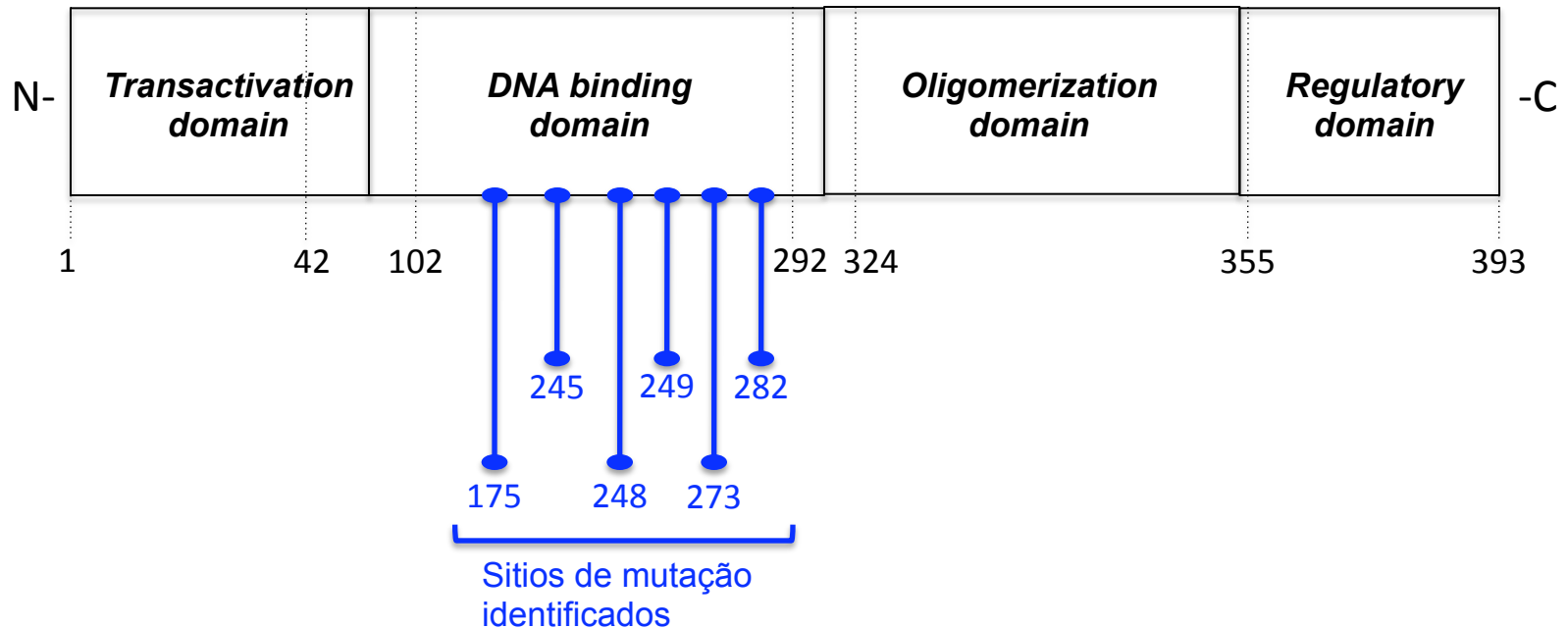
TP53 codifica para uma proteína que actua como um factor de transcrição, sendo por isso capaz de ativar a transcrição genética.

Esta Proteína tem 4 domínios:

- 1.Domínio de transactivação (ativação proteica)
- 2.Domínio de ligação ao DNA (liga-se ao promotor de um gene activando-o)
- 3.Domínio de Oligomerização (ativação imediata da apoptose)
- 4.Domínio de ligação a proteínas de regulação (liga-se ao domínio de transactivação de outras proteínas, activando-as)

# Genes supressores de tumor:

## p53



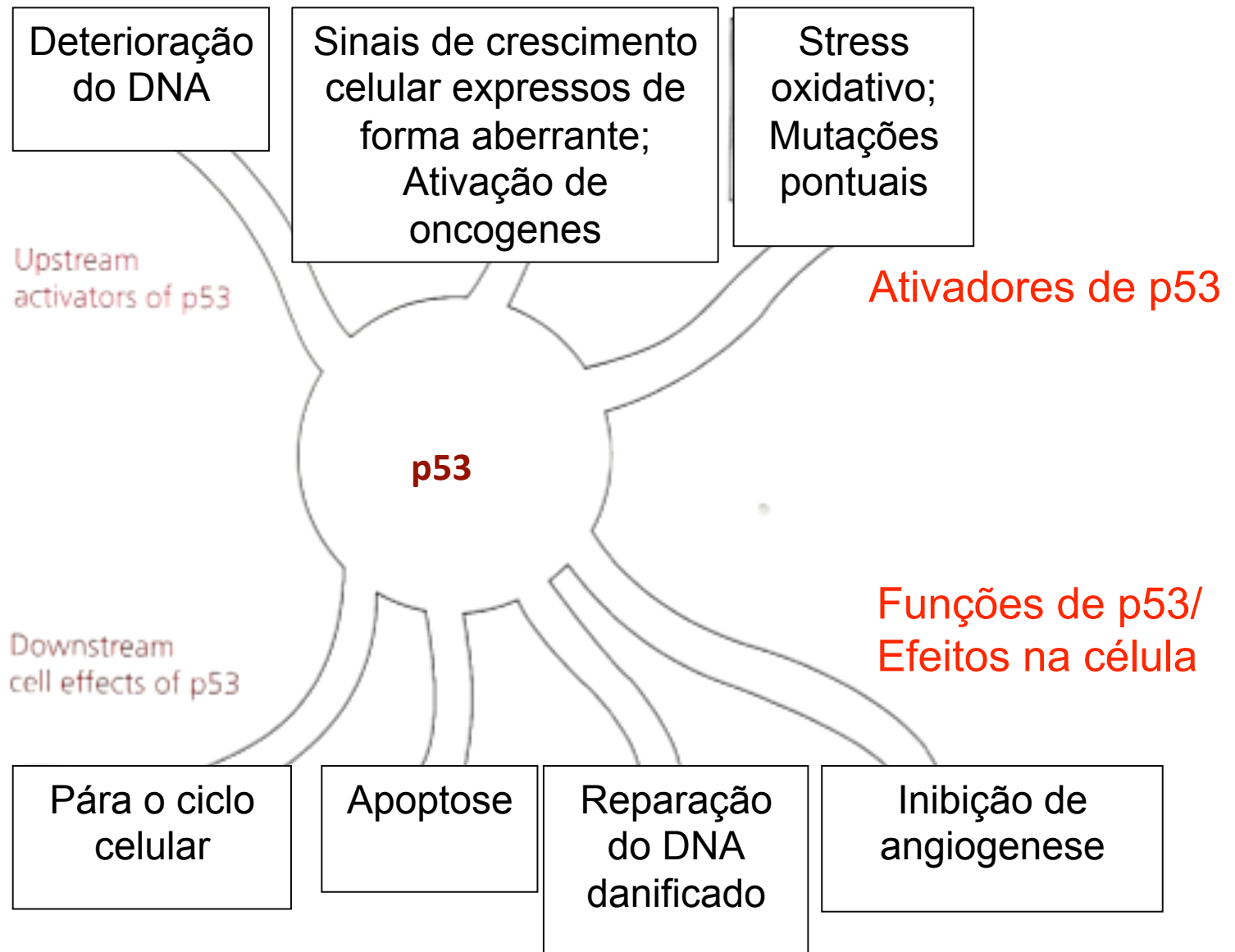
- Mutações no domínio de ligação ao DNA
- Estas mutações resultam numa perda de função da proteína

## **Funções de p53:**

- Detém o ciclo celular ao ativar a cascata de sinalização da apoptose
- A sua capacidade de induzir uma célula para a apoptose é a função principal desta proteína. Desta forma é evitada a propagação de células mutadas
- Reparação de DNA mutado: evita a propagação de uma mutação no genoma de uma célula
- Inibição de angiogenese: evita o desenvolvimento de novos capilares sanguíneos
- Redução do stress oxidativo celular: evita mutações e a deterioração da cadeia de DNA

# Genes supressores de tumor:

**p53**



## Genes supressores de tumor:

### Funções de p53: **Ativação da transcrição genes:**

Genes que promovem a interrupção do ciclo celular:

*Ex: p21*, pára o ciclo celular na fase G1 unindo-se à ciclina E

Genes que promovem a reparação do DNA:

*Ex: p21*, através da sua ligação com *PCNA* (*co-factor de DNA polimerase*) e *XPC* (reconhece e repára DNA danificado)

Genes que promovem a apoptose:

*Ex: puma*, através da regulação negativa sobre *bcl-2* (inibidor de apoptose).

Inibição de angiogenese

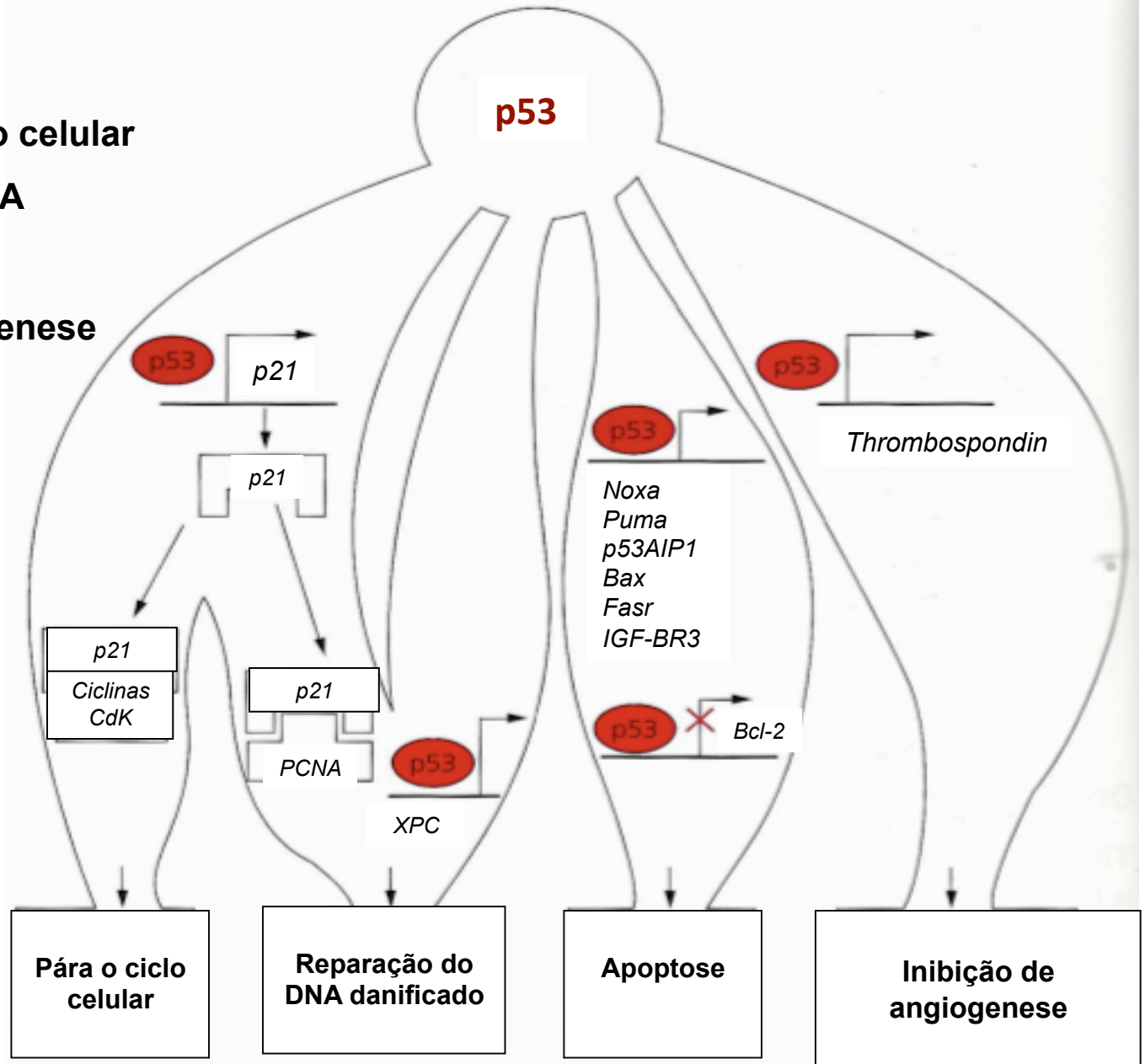
*Ex: Thrombospondin* (proteínas com função anti-angiogénica).

Genes antioxidantes: *sestrins* (gene antioxidante).

# Genes supressores de tumor:

## Funções de p53

1. Detenção do ciclo celular
2. Reparação de DNA
3. Apoptose
4. Inibição de angiogenese



# Genes supressores de tumor:

## Funções de p53      **Redução do stress oxidativo**

- p53 ativa genes antioxidantes o que faz diminuir o stress oxidativo, através da eliminação de ROS (*reactive oxigen species*) numa célula
- ROS, são moléculas quimicamente activas que contem oxigénio
- Estas moléculas são capazes de modificar cerca de 20 000 bases de DNA numa célula, por dia

ROS são originados por agressões celulares externas:

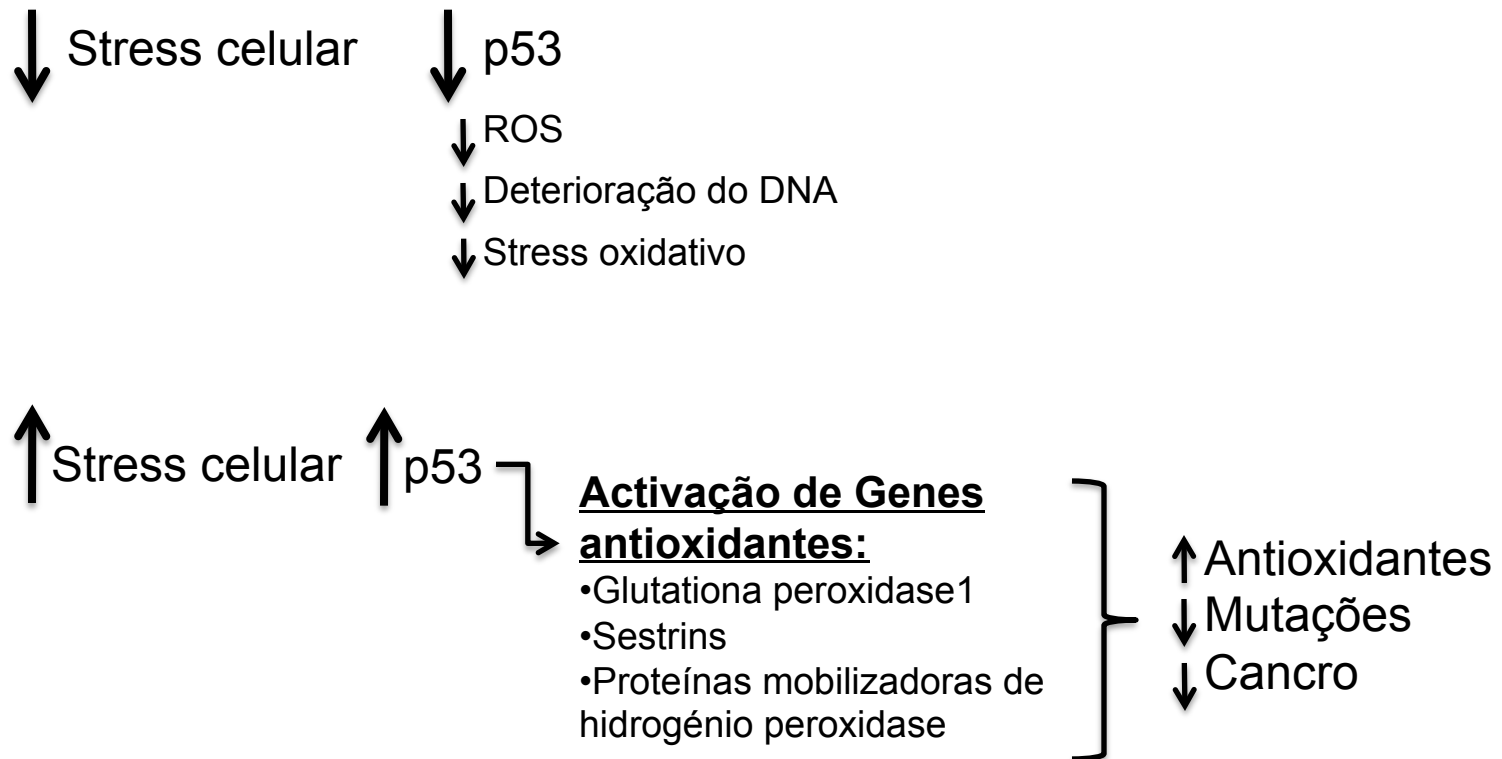
Químicos: Benzeno, hidrocarbonos (tabaco), éter, arsénio, níquel, crómio

Radiações: Radiações UV, raios-X, raios gama

# Genes supressores de tumor:

## Funções de p53      **Redução do stress oxidativo**

Várias espécies de oxigénio ativo são capazes de danificar o DNA, reagindo com este. Ao eliminar estas moléculas reativas, a célula evita erros no DNA .



# Genes supressores de tumor:

## p53 : Silenciamento epigenético

- Recentemente foi descrito que p53 tem a capacidade de unir-se com miR-34 (uma família de microRNA) regulando a sua função na célula.

### Funções de miR-34:

- Ativação da apoptose
- Detenção do ciclo celular
- Indução de aquiescência celular
- Progressão de metástases

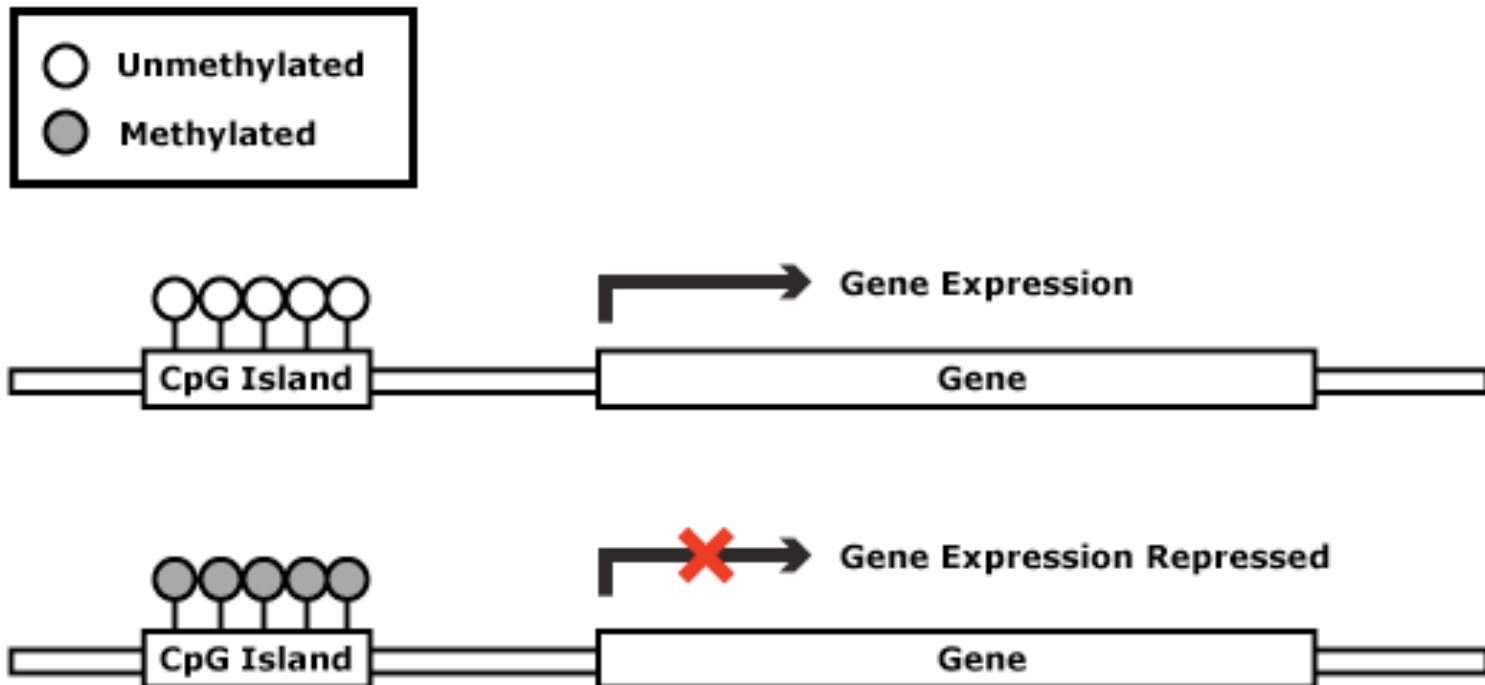
miR-34 é alvo de **silenciamento epigenético** através de hipermetilação de ilhas CpG, em vários tipos de cancro.

# Genes supressores de tumor:

p53: Silenciamento epigenético

## Ilhas CpG

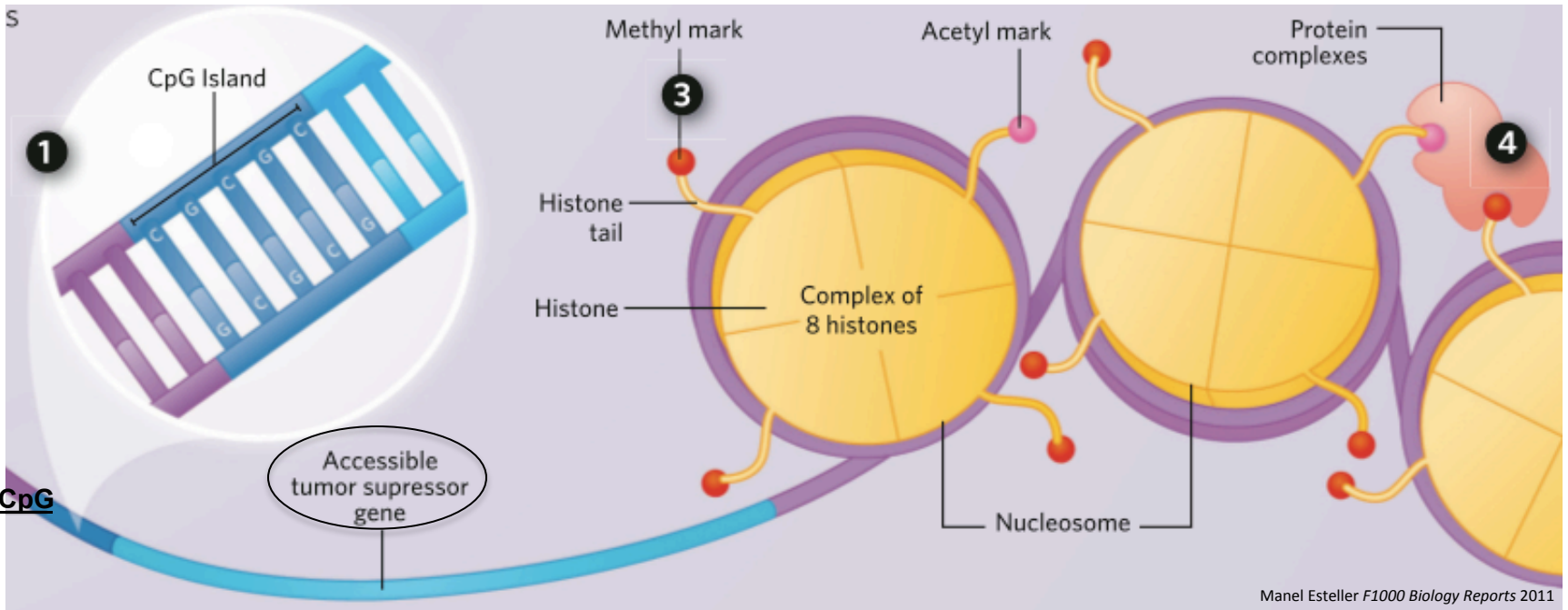
- Localizadas na zona promotora dos genes
- Ricas em citosina e guanina unidas por uma ligação fosfodiéster
- São zonas bastante favoráveis à união de grupo metilo ( $\text{CH}_3$ )



# Genes supressores de tumor:

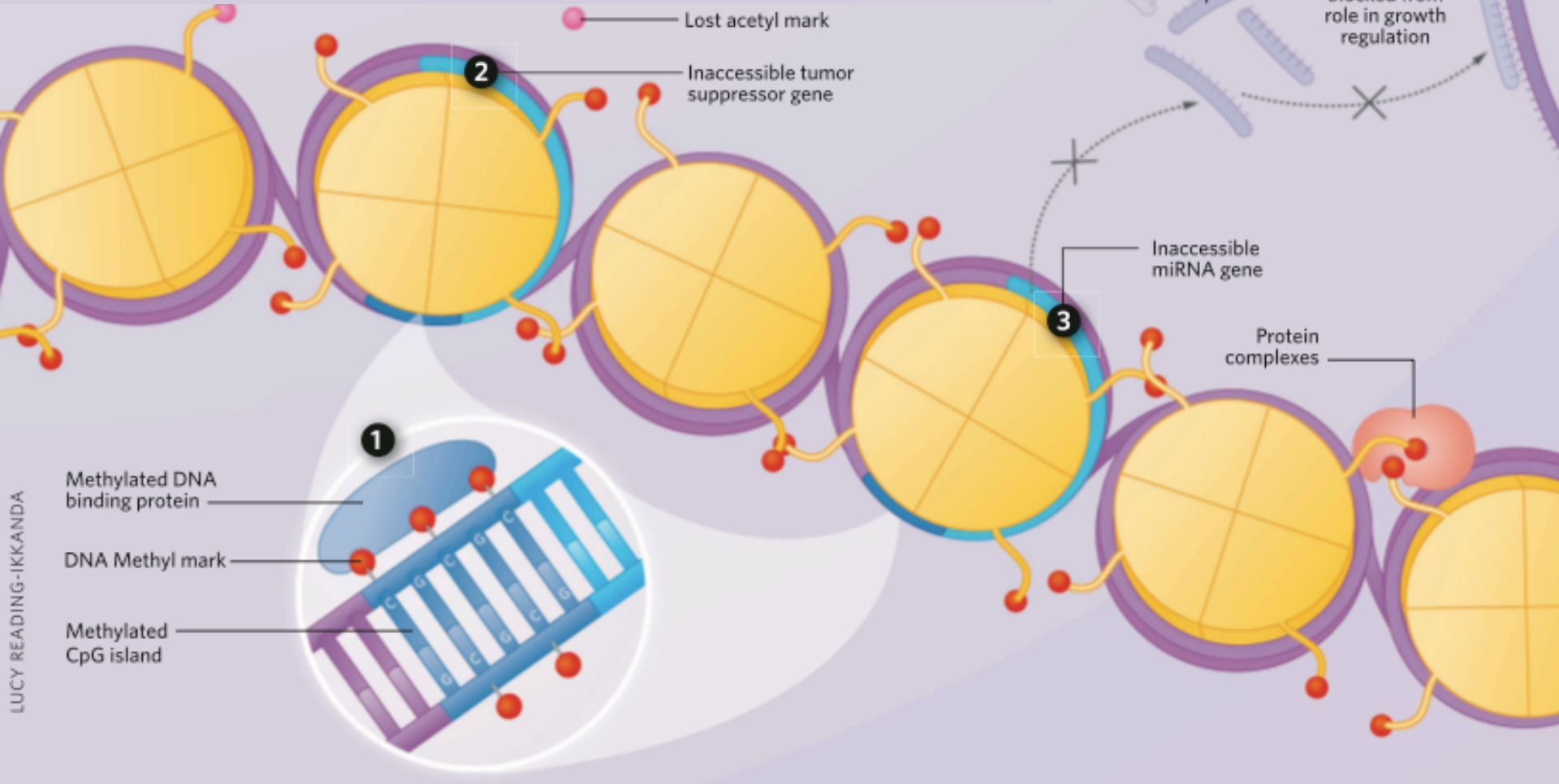
## p53 Silenciamento epigenético

Células normais:



# Células cancerígenas:

- Quando uma ilha CpG se encontra hipermetilada, a transcrição é interrompida.
- 1) Hipermetilação de um gene supressor de tumor resulta na sua inativação
  - 2) O gene encontra-se inacessível e perde a sua marca de acetilação (marca de transcrição activa)
  - 3) Hipermetilação de um gene que codifica para um microRNA (zona intrónica de um gene normal).
  - 4) Inativação do microRNA, dando vantagem à progressão de tumor - **metastases**



# **Diagnóstico e terapêutica**

# Diagnóstico

- **Análises bioquímicas para a detecção de moléculas específicas para um tipo de cancro:**

Produzidos por determinadas células em resposta a cancro

Detectáveis na corrente sanguínea (HCG, PSA)

- **Testes clínicos de imagem:**

Ressonância magnética, raio-X, ultra-som, tomografia

- **Ensaio com iodo reactivo (cancro de tiróide)**

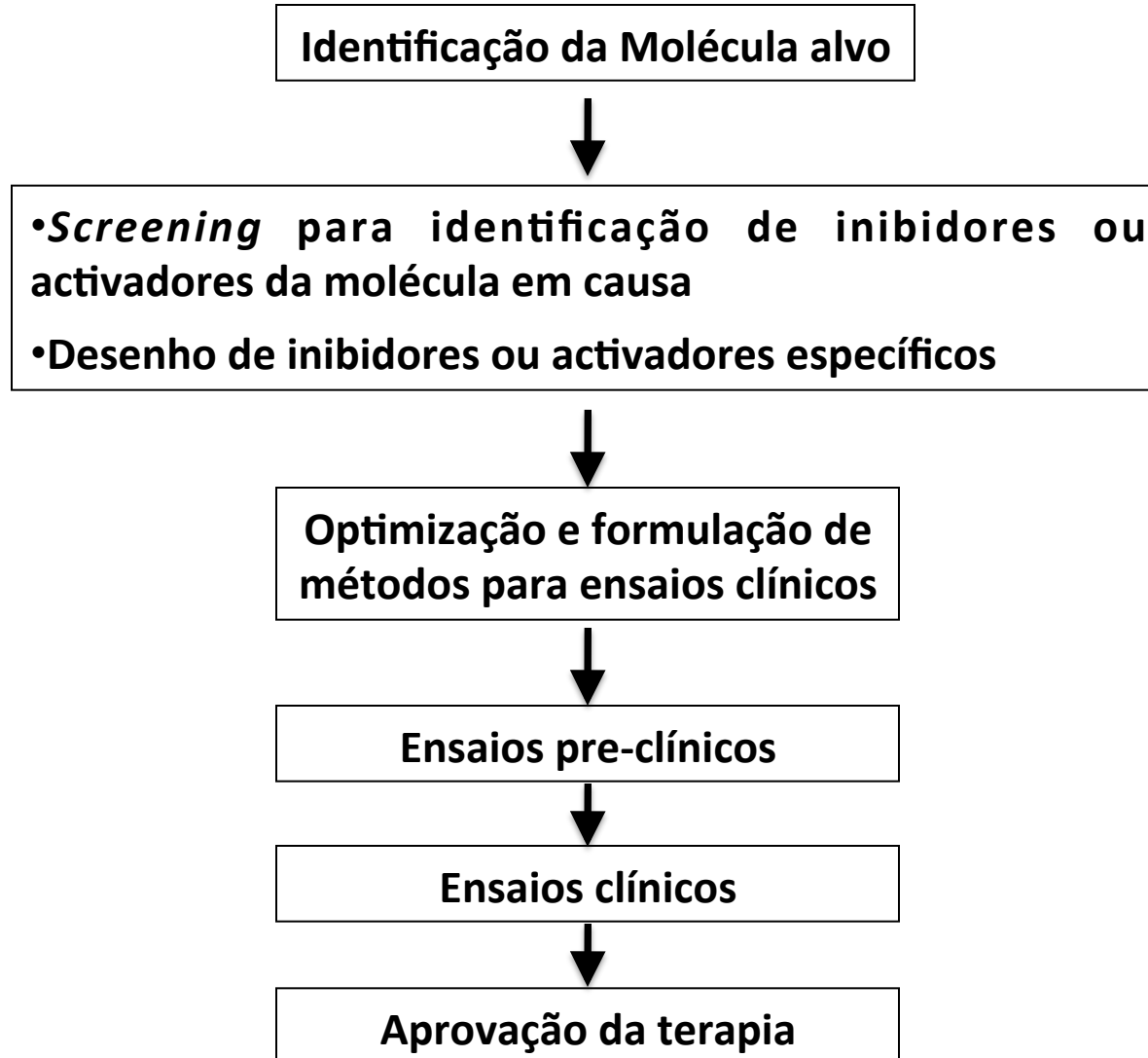
- **Biopsia (normalmente associada ao tratamento)**

# Terapêutica

- Quimioterapia: agentes químicos que destroem todas as células que se dividem rapidamente, uma vez que esta é a principal característica das células cancerígenas. No entanto esta terapia também afecta as células dos folículos pilosos e da medula óssea.
- Radioterapia: usado em cancros pequenos e sem metástases, consiste em destruir as células cancerígenas através de radioisótopos
- Fármacos: medicamentos com especificidade para células cancerígenas
- Intervenção cirúrgica

# Terapêutica

Desenvolvimento de Fármacos:



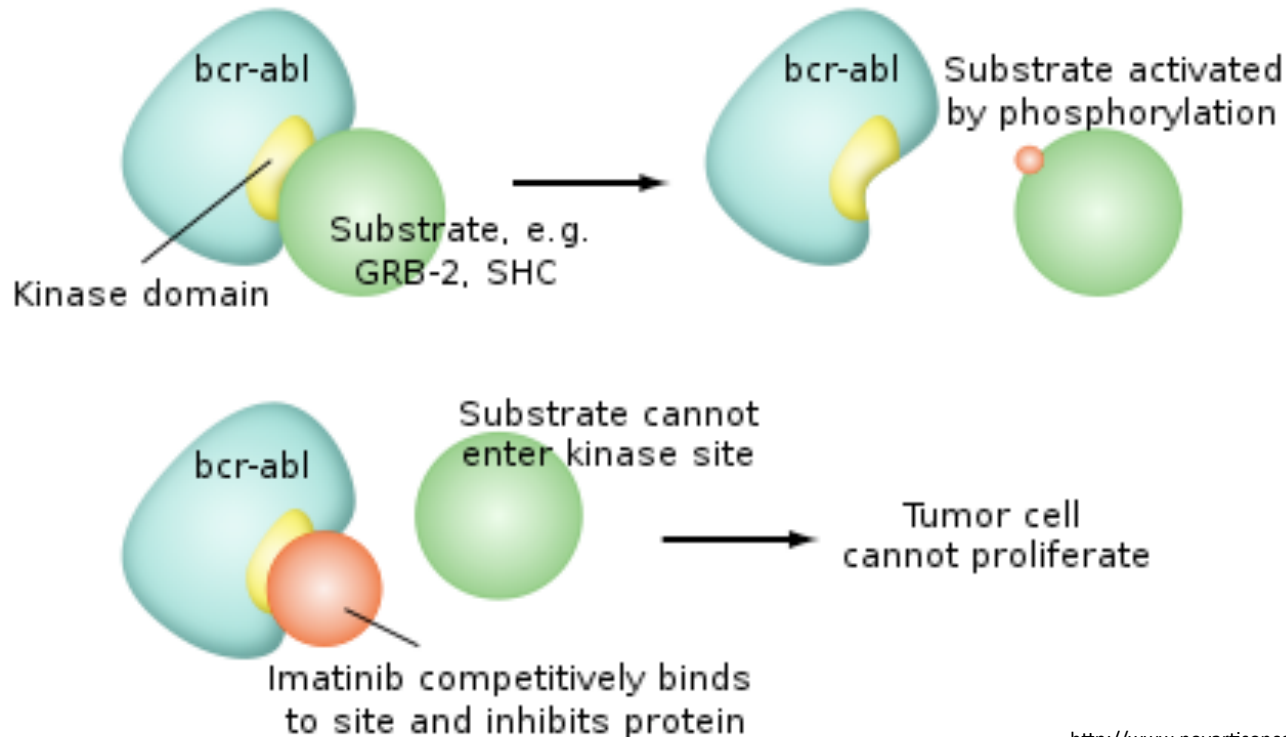
# Terapêutica

Desenvolvimento de Fármacos:

**Identificação da molécula alvo:** bcr-abl (LMC)

**Screening e desenho de inibidores específicos:** Inibidor da proteína tirosina quinase (Proteína quinase C)

Mecanismo de inibição de bcr-abl:



# Terapêutica

Desenvolvimento de Fármacos:

## Ensaio pre-clínicos

Validação biológica: avaliação da capacidade de actuação da proteína no sitio correcto depois de administrada:

- Inibição da actividade de tirosina-quinase em células de cultivo
- Indução da apoptose em células de pacientes
- Inibição do crescimento do tumor em rato (*mus musculus*), através da incorporação de células cancerígenas humanas (*xenografts*)

# Terapêutica

## Desenvolvimento de Fármacos:

### Ensaio Clínicos

- Validação do fármaco através de ensaios em pacientes com leucemia mieloide crónica em diferente fases.

### Aprovação da terapia

- Aprovação do fármaco pela *U.S. Food and Drugs* (2001)
- Aprovação na Europa e no Japão

Proteína alvo: bcr-abl

Proteína de inibição: *Imatinib*

Nome comercial: *Glivec*®



## Bibliografia

### Artigos:

- Kolch W. “Meaningful relationships: the regulation of the ras/raf/MEK/ERK pathway by protein interactions” *Biochem. J.* (2000)
- Karreth A.F et al “ C-Raf is required for initiation of lung cancer by K-Ras” *Cancer discovery* (2011)
- Artigas CG et al. “Detección de secuencias del gen BCR-ABL mediante RT-PCR en pacientes con leucemia en la IX región, Chile” *Revista médica de Chile* (2002)
- Kharas M. et al “ABL oncogenes and phosphoinositide-3-kinase: Mechanism of activation and downstream effectors” *Cancer Research* (2012)
- Arnold J. Levine and Moshe Oren. “The first 30 years of p53: growing ever more complex *Nature review* (2009)
- H Hermeking. “The miR-34 family in cancer and apoptosis”. *Cell Death and Differentiation* (2010)
- Esteller M. *F1000 Biology Reports* (2011)

### Livros:

*Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics.* Second Edition. Lauren Pecorino. Oxford University press (2008)