



PROVAS ACADÉMICAS
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

Doutoramento:
Medicina

Nome do Aluno:
Paula Maria Ferreira Borralho Nunes

Tema da Tese:
Contribuição para o conhecimento da cancerigénese na colite ulcerosa de longa evolução –
Fenotipo aberrante de mucinas e mecanismos relacionados com a sua expressão.

Área:
Medicina

Especialidade:
Anatomia Patológica

Data da Defesa:
17/12/2009

Classificação:
Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

Júri:
Presidiu o Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor Rui Victorino e estiveram presentes os vogais: Professores Doutores Carlos Alberto da Silva Lopes, universidade do Porto, Maria Paula Guerreiro Chaves Pascoal, Universidade da Beira Interior, Ana Maria Félix Campos Pinto, Universidade Nova de Lisboa, Jorge Manuel Oliveira Soares, Henrique Manuel Bicha Castelo, Maria Isabel Silvério Fonseca Soares, todos da Universidade de Lisboa.



PROVAS ACADÉMICAS
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

RESUMO

A colite ulcerosa é uma doença inflamatória crónica primitiva da mucosa intestinal, de etiologia desconhecida, que afecta de forma contínua o recto e uma extensão variável do cólon. É uma das poucas condições pré-neoplásicas conhecidas do intestino, na qual ocorre a progressão de lesões da mucosa inflamada e com epitélio reactivo até ao adenocarcinoma invasivo, motivo pelo qual escolhemos este modelo no processo de investigação da cancerígenese do cancro colorectal (CCR) em contexto de inflamação crónica.

Continuam por esclarecer passos da sequência de eventos moleculares que identificam as transições inflamação→displasia→carcinoma. O presente estudo teve como objectivo geral contribuir para esclarecer alguns mecanismos associados a essa sequência ao investigar o desenvolvimento de populações celulares metaplásicas de tipo gástrico, procurando estabelecer a sua relação com a displasia e a neoplasia numa população de doentes com colite ulcerosa de longa evolução. Foi também propósito deste estudo avaliar se havia relação entre a presença aberrante de apomucinas de tipo gástrico e a expressão dos genes *homeobox* eventualmente responsáveis pela diferenciação do epitélio gástrico, numa tentativa de elucidar alguns mecanismos implicados no controlo da diferenciação celular no contexto específico desta patologia.

Estudámos a expressão de apomucinas de tipo gástrico (MUC5AC e MUC6) e os genes *SOX2* e *Pdx1* (através da expressão dos factores de transcrição *SOX2* e *Pdx1* e da avaliação dos níveis de metilação da região promotora dos genes) em 130 doentes com colite ulcerosa subdivididos em dois grupos, respectivamente sem displasia/neoplasia (grupo I, n = 105) e com displasia ou adenocarcinoma (grupo II, n = 25). Usámos métodos imunohistoquímicos e de PCR quantitativo específico para metilação – QMSP, bem como efectuámos a observação em microscopia convencional de luz, para a caracterização morfológica das amostras e para a avaliação dos resultados sobre os estudos de imunexpressão com os antisoros usados.

A série estudada revelou-se, pela análise dos dados clínicos e histológicos, representativa do perfil clínico-epidemiológico dos doentes com colite ulcerosa em seguimento em serviços hospitalares especializados. Demonstrou-se que havia expressão aberrante das duas apomucinas gástricas estudadas, com tendência para reproduzirem o padrão habitual da mucosa gástrica (marcação positiva predominantemente no terço superficial da mucosa para a MUC5AC e no terço profundo para MUC6). A expressão de MUC5AC, presente em 72,1% dos casos, foi mais frequente nos doentes do grupo II (67,3% vs. 92,0%; p = 0,000) e correlacionou-se com a distorção arquitectural da mucosa (R = 0,511; p = 0,000) e com parâmetros associados com a inflamação (actividade, intensidade, duração da doença). Para a expressão de MUC6, presente em 21% das amostras, observou-se uma percentagem de casos positivos muito maior no grupo de doentes com displasia / adenocarcinoma (57,7% vs. 10,7%; p = 0,000), havendo correlação com a expressão de MUC5AC, (R = 0,433; p = 0,000), a extensão da doença (R = 0,325; p = 0,000) e a presença de displasia (R = 0,488; p = 0,000).

Evidenciou-se a expressão anormal dos factores de transcrição *SOX2* (18% dos casos avaliados) e *Pdx1* (73,3% dos casos avaliados), quer em mucosa com alterações regenerativas quer em mucosa neoplásica. A presença de *SOX2* em neoplasias foi mais constante nas áreas tumorais que exibiam menor grau de diferenciação ou que tinham padrão mucocelular. Quando se compararam os resultados em função da divisão dos doentes em grupo I vs. grupo II, observaram-se diferenças estatisticamente significativas apenas quanto à presença de *SOX2* (p = 0,000). Observou-se também que havia uma correlação negativa entre esta variável e a utilização de agentes terapêuticos e uma correlação positiva com a expressão das duas apomucinas estudadas, mais nítido com a MUC6 (R=0,412, p = 0,000) e ainda com a presença

de displasia ($R = 0,522$, $p = 0,000$). A expressão de *Pdx1* correlacionou-se com distorção e com expressão aberrante de MUC5AC ($R = 0,383$; $p = 0,000$).

Os níveis de metilação da região promotora dos genes foram avaliados em 30 casos em que se observou a expressão de apomucinas e dos factores de transcrição. Foi detectada metilação da região do promotor do gene *SOX2* em 6 casos, 1 dos quais correspondeu a mucosa não neoplásica e os restantes a mucosa neoplásica. Quando comparadas as médias dos valores de coeficiente de metilação dos grupo I vs. grupo II, não se observou diferenças estatisticamente significativas. O coeficiente de metilação correlacionou-se com a presença de displasia/neoplasia, não se tendo identificado qualquer correlação significativa com as restantes variáveis histológicas estudadas. Não se observou ainda haver correlação com a expressão de apomucinas e dos factores de transcrição investigados.

Verificou-se ausência de metilação da região do promotor do gene *Pdx1* em 26 amostras e detectou-se metilação do promotor nas 4 amostras restantes. Não se identificaram diferenças significativas quando comparadas as médias dos valores de coeficiente de metilação entre os grupos de doentes. Não se observou correlação com as diferentes variáveis histológicas e clínicas, bem como com a expressão de apomucinas e de factores de transcrição.

Assim, de acordo com os resultados obtidos conclui-se que a sequência “adenoma -carcinoma” universalmente aceite no CCR esporádico poderá, nas formas tumorais originadas em doentes com colite ulcerosa de longa evolução, incluir o percurso biopatológico: “inflamação → metaplasia/diferenciação anómala → displasia → carcinoma”, tal como é sugerido pela expressão aberrante de mucinas, em especial de MUC6. A presença de metaplasia será, porventura, um evento precoce na via de cancerigénese em doentes com colite ulcerosa. O gene *SOX2* desempenha provavelmente um papel importante nesta sequência, quer através da sua relação com expressão de MUC6, quer participando eventualmente em alguns dos eventos moleculares que levam ao desenvolvimento da neoplasia. Esta participação parece ser um acontecimento molecular “tardio”, posterior à aquisição de uma expressão de mucinas aberrantes e, provavelmente, determinante no aparecimento de adenocarcinomas com menor grau de diferenciação ou de subtipos histológicos particulares (mucocelular). A constatação, nesta série, de que há analogias com a via “serreada”, descrita no CCR esporádico e a que se atribuem como lesões precursoras, o póliplo hiperplásico e o adenoma serreado sésil, sugere que poderá ocorrer uma cadeia de eventos moleculares sobreponível que conduza à cancerigénese na colite ulcerosa. Esta via, que incluirá, seguramente, uma etapa metaplásica, poderia, por isso mesmo, ser chamada “via metaplásica”, reflectindo de forma mais ajustada as modificações do fenótipo biológico que lhe estão subjacentes. Não sendo por certo a única via responsável por casos de CCR em colite ulcerosa é, muito provavelmente, uma das mais importantes neste contexto.

Em sùmula, o presente estudo procurou contribuir para melhorar a compreensão da carcinogénese colorectal no contexto de inflamação crónica, postulando a existência de uma via “metaplásica” num número significativo de CCR que ocorrem em doentes com colite ulcerosa. O melhor entendimento das vias de cancerigénese envolvidas no cancro colorectal, no contexto de colite ulcerosa e a comprovação de que a expressão aberrante de MUC6 e de *SOX2* representam marcadores precoces de evolução para neoplasia na mucosa intestinal com inflamação crónica, poderão concorrer para definir com maior apropriação e rigor nos programas de vigilância dos doentes afectados pela doença.