

O complexo destruidor de betacatenina no carcinoma colorretal e no adenoma cólico

The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma

Guilherme Muniz Bourroul¹, Hélio José Fragoso¹, José Walter Feitosa Gomes¹, Vivian Sati Oba Bourroul¹, Celina Tizuko Fujiyama Oshima², Thiago Simão Gomes², Gabriela Tognini Saba³, Rogério Tadeu Palma¹, Jaques Waisberg¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar o complexo de destruição da betacatenina no carcinoma colorretal e no adenoma do colo pela expressão das proteínas betacatenina, *adenomatous polyposis coli*, GSK3 β , axina e ubiquitina. **Métodos:** Amostras de tecidos de 64 doentes com carcinoma colorretal e de 53 pacientes com adenoma do colo foram analisadas. Blocos de tecidos foram submetidos ao estudo imuno-histoquímico com anticorpos policlonais nos tecidos do carcinoma, mucosa não neoplásica adjacente e adenoma. A imunorreatividade foi avaliada pela porcentagem de positividade de células coradas e pela intensidade do grau de coloração das proteínas no citoplasma e no núcleo das células. Na análise estatística, foram utilizados o coeficiente de correlação de Spearman, os testes *t* de Student, χ^2 , Mann-Whitney e de McNemar, e a análise de regressão logística univariada. **Resultados:** No carcinoma colorretal, as expressões da betacatenina e da *adenomatous polyposis coli* foram significativamente maiores do que em adenomas do colo ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). A imunorreatividade das proteínas GSK3 β , axina 1 e ubiquitina foi significativamente maior ($p = 0,03$, $p = 0,039$ e $p = 0,03$, respectivamente) no carcinoma colorretal do que no adenoma e na mucosa não neoplásica adjacente. A coloração imuno-histoquímica dessas proteínas não apresentou diferenças significantes em relação às características clinicopatológicas do câncer colorretal e do adenoma. **Conclusões:** Em adenomas, as menores expressões de betacatenina, axina 1 e GSK3 β indicaram que o complexo de destruição da betacatenina estava conservado, enquanto que, no carcinoma colorretal, o aumento das expressões da betacatenina, GSK3 β , 1 axina, e ubiquitina indicaram que o complexo de destruição de betacatenina estava alterado.

Descritores: Neoplasias colorretais; Adenoma; Imuno-histoquímica; beta Catenina; Genes APC; Glicogênio sintase; Proteína axina; Ubiquitina; Via de sinalização Wnt

ABSTRACT

Objective: To evaluate the destruction complex of beta-catenin by the expression of the proteins beta-catenin, adenomatous polyposis coli, GSK3 β , axin and ubiquitin in colorectal carcinoma and colonic adenoma. **Methods:** Tissue samples from 64 patients with colorectal carcinoma and 53 patients with colonic adenoma were analyzed. Tissue microarray blocks and slides were prepared and subjected to immunohistochemistry with polyclonal antibodies in carcinoma, adjacent non-neoplastic mucosa, and adenoma tissues. The immunoreactivity was evaluated by the percentage of positive stained cells and by the intensity assessed through of the stained grade of proteins in the cytoplasm and nucleus of cells. In the statistical analysis, the Spearman correlation coefficient, Student's *t*, χ^2 , Mann-Whitney, and McNemar tests, and univariate logistic regression analysis were used. **Results:** In colorectal carcinoma, the expressions of beta-catenin and adenomatous polyposis coli proteins were significantly higher than in colonic adenomas ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). The immunoreactivity of GSK3 β , axin 1 and ubiquitin proteins was significantly higher ($p = 0.03$, $p = 0.039$ and $p = 0.03$, respectively) in colorectal carcinoma than in the colonic adenoma and adjacent non-neoplastic mucosa. The immunohistochemistry staining of these proteins did not show significant differences with the clinical and pathological characteristics of colorectal cancer and colonic adenoma. **Conclusions:** These results suggest that, in adenomas, the lower expression of the beta-catenin, axin 1 and GSK3 β proteins indicated that the destruction complex of beta-catenin was maintained, while in colorectal carcinoma, the increased expression of beta-catenin, GSK3 β , axin 1, and ubiquitin proteins indicated that the destruction complex of beta-catenin was disrupted.

Keywords: Colorectal neoplasms; Adenoma; Immunohistochemistry; beta Catenin; Genes, APC; Glycogen synthase; Axin protein; Ubiquitin; Wnt signaling pathway

¹ Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", São Paulo, SP, Brasil.

² Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

³ Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

Autor correspondente: Jaques Waisberg – Avenida Ibirapuera, 981, 6º andar, sala 602 – Vila Clementino – CEP: 04029-000 - São Paulo, SP, Brasil – Tel: (11) 4573-9344 – E-mail: jaqueswaisberg@uol.com.br

Data de submissão: 16/3/2016 – Data de aceite: 3/6/2016

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082016AO3678



INTRODUÇÃO

Todas as células existem sob regulação rigorosa de sinais de crescimento, apoptose, diferenciação, interações célula-célula e interações célula-matriz extracelular.⁽¹⁾ O câncer colorretal (CCR) é resultado do efeito cumulativo de diversas mutações dentro da célula, que permitem que ela perca o controle de crescimento e os mecanismos regulatórios.^(1,2) Está claro que a acumulação de mutações genéticas em uma célula clonal resulta na transição das células epiteliais normais do cólon para o carcinoma colorretal.⁽³⁾

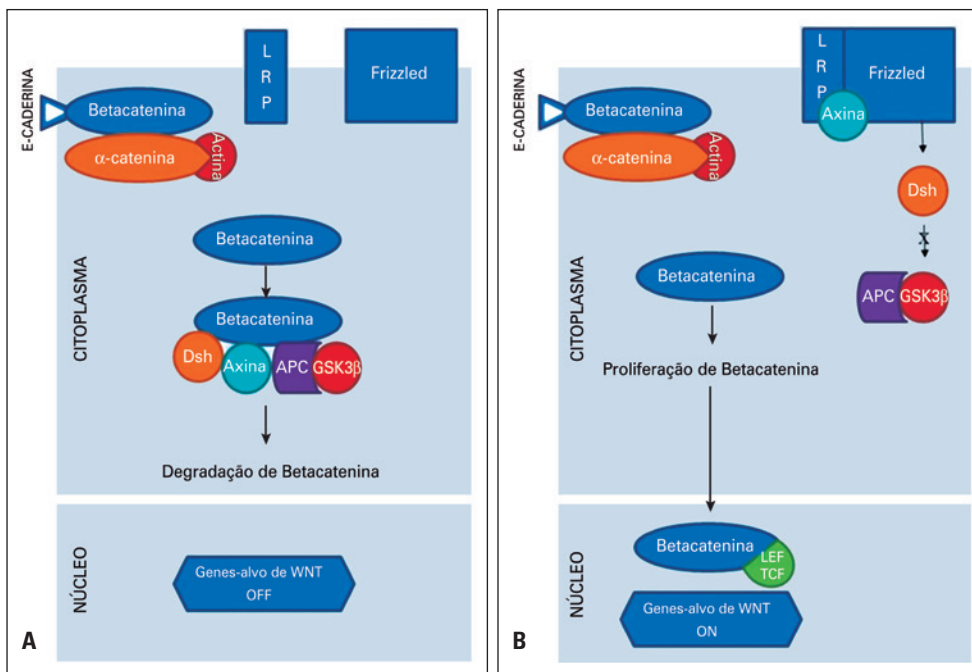
A betacatenina, da família das proteínas cateninas, é uma proteína bifuncional, que regula a coordenação de adesão célula-célula e a transcrição genética.⁽⁴⁾ Trata-se de uma subunidade do complexo proteico de caderina que age como transdutora do sinal intracelular na via de sinalização Wnt.^(3,4)

A via de sinalização Wnt canônica, agindo por meio da betacatenina, modula diversos processos celulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência, a apoptose, a diferenciação, a adesão celular e a motilidade.

O efetor Wnt betacatenina é um coativador transcrricional que também pode sofrer mutação para um oncogene potente, enquanto a via de sinalização Wnt canônica estabiliza a transcrição de betacatenina.^(4,5) As mutações e a superexpressão de betacatenina estão as-

sociadas a diversos tipos de neoplasias, incluindo carcinoma hepatocelular, carcinoma colorretal, câncer de pulmão, tumores malignos da mama e do ovário e carcinomas do endométrio.⁽⁶⁾

O excesso de betacatenina citoplasmática é incorporado em um complexo de múltiplas subunidades, que inclui a destruição das proteínas axina 1, *adenomatous polyposis coli* (APC), caseína quinase 1 (CK1) e glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β).⁽⁴⁾ Na ausência de um sinal de Wnt, a betacatenina se liga à proteína supressora de tumor APC, e essa proteína é recrutada para o complexo de destruição, que promove sua fosforilação por axina, CK1 e GSK3β.^(1,3,4,6) A fosforilação da betacatenina por GSK3β leva à sua ubiquitinação, formando o complexo poliubiquitina/betacatenina que, subsequentemente, é degradado em um proteossoma.^(4,6) A mutação de genes corresponde à formação da destruição complexa da proteína betacatenina e desencadeia uma série de eventos que levam à ruptura do complexo APC/axina 1/GSK3β e à acumulação de betacatenina desfosforilada no citoplasma.^(1,4) Então, a proteína estabilizada da betacatenina se transloca para o núcleo, no qual ativa a expressão de uma variedade de genes em associação com o fator de células T (TCF) e o fator potencializador linfoide (LEF), ambos fatores de transcrição que ativam os genes alvo relacionados à carcinogênese (Figura 1).^(1,3,4)



LRP: proteína relacionada ao receptor de lipoproteína; Dsh: Dishevelled; APC: *adenomatous polyposis coli*; GSK3β: axina/glicogênio sintase quinase 3β; LEF: fator potencializador linfoide; TCF: fator de células T.

Figura 1. Via de sinalização de Wnt/betacatenina. (A) Na presença do complexo destruidor, a betacatenina é degradada via *adenomatous polyposis coli*/axina/glicogênio sintase quinase 3β. (B) Quando a ligação da betacatenina com o complexo pela destruição não ocorre, ela não é fosforilada, e a proteína penetra no núcleo da célula. Dentro do núcleo, a betacatenina liga-se a genes alvo do fator de transcrição, fator potencializador linfoide/fator de células T, para promover a carcinogênese

A sequência adenoma-carcinoma, hoje em dia, ainda representa o paradigma e o suporte de nosso conhecimento sobre a base molecular e genética da doença. No CCR humano, existe a hipótese de que a ativação da sinalização de Wnt é o evento chave para o início de um adenoma, e de que mutações adicionais são necessárias para que o adenoma progrida e se torne um carcinoma.⁽²⁻⁴⁾ Há muitas evidências que sugerem que a ativação aberrante da sinalização de Wnt após a perda de APC seja uma das principais causas da formação de adenoma do cólon.⁽⁴⁻⁶⁾ Estudos de ganho e perda de função sobre proteínas Wnt e betacatenina sugeriram que a ativação aberrante de sinalização de Wnt, após perda de APC, seja responsável pelo início de adenoma intestinal.^(3,7) Desse modo, a hiperativação da sinalização de Wnt é geralmente vista como o evento chave para o início de um adenoma intestinal após a perda de APC.^(4,8) Um importante passo é a elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes às funções cooperativas da sinalização de Wnt, o que pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos para prevenção e tratamento de câncer gastrointestinal.^(6,8)

As mutações genéticas acumuladas durante o desenvolvimento de tumores são responsáveis pela desregulação de importantes vias de transdução de sinal, como Wnt, responsável pelo crescimento celular descontrolado, inibição de apoptose e imortalização.^(2,4,5) Todavia, ainda se sabe muito pouco sobre as interações e influências mútuas dessa via defeituosa, e sobre os mecanismos responsáveis pela instabilidade genética, que contribui para o estabelecimento de diversos defeitos genéticos necessários para impulsionar a progressão de malignidade de tumores.^(1,2,4)

Ao definir as alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento de CCR esporádico, é possível contar com o sucesso de segmentação molecular específica para o tratamento de tumores já estabelecidos e também para intervenções de quimioprevenção.^(7,8)

OBJETIVO

Avaliar o complexo de destruição de betacatenina pela expressão de betacatenina, *adenomatous polyposis coli*, glicogênio sintase quinase 3 β , axina e proteínas ubiquitinas em carcinoma colorretal e adenoma do cólon. Ao definirmos as alterações proteicas da via de sinalização de Wnt envolvidas no adenoma e no câncer colorretal, podemos contar com o sucesso de segmentação molecular específica para o tratamento de tumores já estabelecidos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal e retrospectivo. Um total de 64 pacientes com CCR e 53 pa-

cientes com adenoma do cólon foram estudados. Entre 2006 e 2010, 64 pacientes com CCR foram submetidos consecutivamente à cirurgia curativa para ressecção de tumores colorretais. Pacientes com adenoma do cólon tiveram seu adenoma removido por colonoscopia.

Os critérios de inclusão foram pacientes adultos com CCR ou adenoma colorretal confirmados por análise histológica. Critérios de exclusão foram presença de neoplasia colorretal hereditária sem polipose (síndrome de Lynch), CCR associado à doença inflamatória do intestino e síndromes de polipose intestinal.

Em pacientes submetidos à cirurgia para CCR, 64 amostras de tecido foram obtidas do tumor e da mucosa colorretal não neoplásica adjacente, localizada a 10cm da margem superior da neoplasia. Nos 53 pacientes com adenomas de cólon, 71 adenomas foram ressecados.

Entre os pacientes operados com CCR, 33 (51,6%) eram do sexo feminino. A idade mediana foi 69,2 \pm 7,4 anos (51 a 90 anos). O CCR estava localizado no cólon em 38 (59,4%) dos pacientes e no reto em 26 (40,6%).

Com relação aos adenomas, 27 (50,9%) dos pacientes eram do sexo masculino. A idade mediana foi 60,7 \pm 3,4 anos de idade (29 a 88 anos). Os adenomas estavam localizados no cólon esquerdo em 46 (86,9%) dos pacientes e no cólon direito em 7 (13,2%). Não houve adenomas retais.

Entre os pacientes com CCR, as informações foram registradas com relação à localização, tamanho, nível de invasão na parede intestinal, grau de infiltrado inflamatório, envolvimento de linfonodos, grau de diferenciação do tumor, invasão linfática/vascular/neural, Classificação de Tumores Malignos (TNM),⁽⁹⁾ presença de metástases síncronas e imunocoloração (intensidade da coloração e porcentagem de escore de células coradas) dos anticorpos usados no tecido colorretal. Nos pacientes com adenoma do cólon, foram registradas estatísticas sobre as características morfológicas da neoplasia (localização, tipo histológico e grau de atipia celular) e a imunocoloração (intensidade da coloração e porcentagem de escore de células coradas) no tecido colônico.

Os tecidos foram fixados em formalina e rotineiramente processados embebidos em parafina para análise histológica. Cortes histológicos com espessura de 3 μ foram obtidos de cada bloco. Todas as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e revisadas pelo patologista para confirmação de diagnóstico.

Nas lâminas coradas, as áreas do tumor foram identificadas para a preparação de microarranjo de tecido (TMA, sigla do inglês *tissue microarray*). O bloco de TMA foi preparado com o equipamento Beecher™ (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EUA), de

acordo com o protocolo previamente descrito usado em nosso laboratório.⁽¹⁰⁾ Os blocos de parafina foram cortados com espessura de 3 μ m, e as lâminas foram preparadas para o estudo imuno-histoquímico. Os anticorpos usados incluíam: primário policlonal de coelho antibetacatenina; policlonal de coelho anti-APC; primário policlonal de coelho anti-GSK3 β ; primário policlonal de coelho anti-axina; e primário policlonal de camundongo antiubiquitina (todos da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Todos os anticorpos foram utilizados com uma diluição de 1:100. Os controles positivos utilizados incluíam tecido do cólon normal para APC e axina, lisado de células inteiras HeLa para GSK3 β e ubiquitina, e câncer de cólon humano para betacatenina. Uma lâmina similar foi usada como controle negativo, subtraindo o anticorpo primário da reação.

Os anticorpos antibetacatenina, anti-APC e anti-GSK3 β foram usados no tecido do CCR, adenoma de cólon e mucosa adjacente não neoplásica. Os anticorpos anti-axina e antiubiquitina foram usados no tecido do CCR e na mucosa adjacente não neoplásica (Figura 2).

O escore de imunopositividade foi preparado de acordo com o método descrito por Hao et al.⁽⁶⁾ A positividade foi considerada como escore zero quando menos de 5% das células epiteliais estavam coradas na neoplasia; escore 1, quando essa porcentagem estava entre 5% e 25%; escore 2, se entre 26% e 50%; escore 3, se entre 51% e 75%; e escore 4, se mais de 75% das células epiteliais estavam coradas na neoplasia. A intensidade foi considerada como escore zero quando não apareceram células coradas; escore 1, quando a coloração estava fraca; escore 2, quando a coloração estava moderada; e

escore 3, quando a intensidade das células coradas estava forte. O escore final da imunopositividade, que variou entre zero e 12, foi obtido pela multiplicação dos escores de intensidade e positividade. A imunopositividade foi classificada como reduzida quando o escore final estava entre zero e 8, e como forte quando entre 9 e 12.

Todas as lâminas foram analisadas por dois pesquisadores capacitados e independentes, sem acesso a informações patológicas. O escore final (zero a 12) foi resultado de um escore médio dos pesquisadores. Na maioria dos casos, houve concordância entre as duas avaliações do escore final. Quando não houve concordância, um escore de consenso foi adotado.

A perda por falha técnica ou resultados inconclusivos impossibilitaram a avaliação do estudo imuno-histoquímico de algumas das amostras, e esses eventos acarretaram na exclusão delas do estudo.

Os resultados quantitativos foram descritos como média e desvio padrão, e os dados qualitativos foram descritos como frequências. A correlação entre os escores de expressão imuno-histoquímica das proteínas com parâmetros clinicopatológicos foi calculada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os testes *t* de Student, χ^2 , Mann-Whitney e McNemar foram usados para avaliar a significância das diferenças nos parâmetros clinicopatológicos e associações com a imunopositividade das proteínas. A análise de regressão logística univariada (Análise de Variância – ANOVA) e a análise multivariada foram usadas para identificar as variáveis dependentes e independentes. O nível de significância estatística foi definido em 5% ($p < 0,05$), e os dados foram analisados pelo *software Statistical Package for Social Sciences*[®] (SPSS[®], Chicago, IL, USA), versão 17.0.

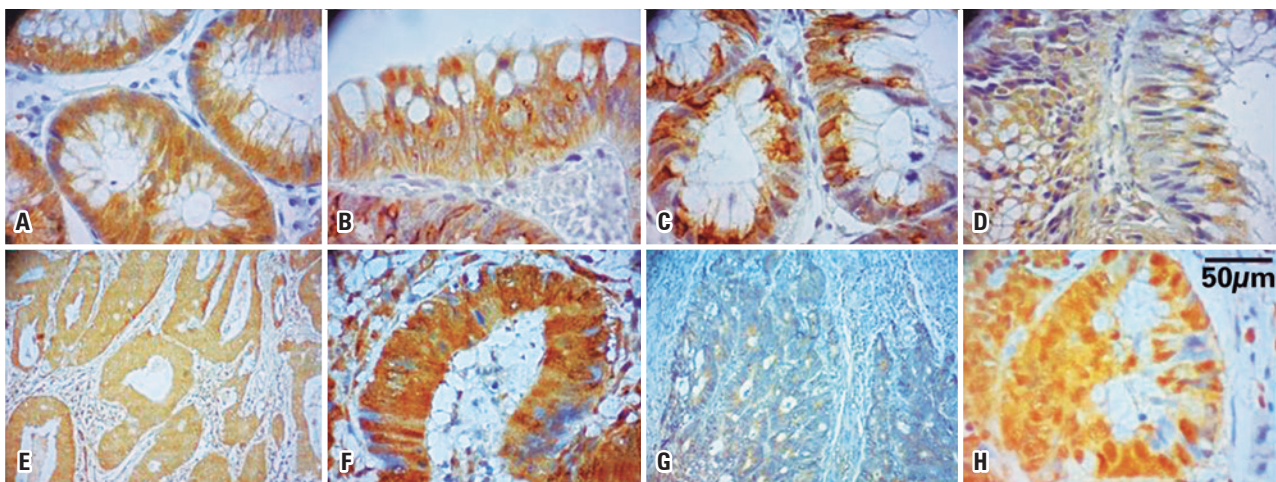


Figura 2. Fotomicrografias da coloração imuno-histoquímica das proteínas representadas pela cor acastanhada no citoplasma das células. Betacatenina (A – adenoma do cólon, 200X; B – carcinoma colorretal, 200X), *adenomatous polyposis coli* (C – adenoma do cólon, 200X; D – carcinoma colorretal, 200X), GSK3 β (E – adenoma do cólon, 100X, F – carcinoma colorretal 200X), axina 1 (G – carcinoma colorretal, 100X), ubiquitina (H – carcinoma colorretal, 200X)

O presente estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinque da *World Medical Association* e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição, CAAE: 0042.0.338.000-09.

RESULTADOS

Com relação ao CCR, o tamanho médio dos tumores foi de $5,2 \pm 1,3$ cm (0,5 a 12 cm). O tamanho do tumor ao longo do seu eixo mais longo era de >5 cm em 43 (67,1%) dos pacientes, e ≤ 5 cm em 21 (32,8%) deles. Metástases linfonodais foram encontradas em 31 (48,4%) pacientes. Invasão de vasos sanguíneos foi observada em 21 (32,8%) dos pacientes, invasão de vasos linfáticos em 24 (37,5%) e invasão neural em 12 (18,7%). Onze (17,2%) carcinomas mostraram-se bem diferenciados, 51 (79,7%) mostraram-se moderadamente diferenciados e 2 (3,1%) mostraram-se pouco diferenciados. O CCR infiltrou superficialmente (T1 + T2) a parede intestinal em 18 (28,1%) dos pacientes, e profundamente (T3 + T4) em 46 (71,9%). A presença de metástases síncronas foi observada em 14 (21,9%) pacientes. Recaídas ocorreram em 13 (20,3%) pacientes e 12 (18,7%) deles morreram por essa razão. O tempo médio de seguimento foi $19,1 \pm 2,8$ meses (3 a 36 meses).

O tamanho médio dos pólipos era de $0,6 \pm 0,2$ cm (0,4 a 1,7 cm). Os pólipos tinham $<1,0$ cm em 34 (64,1%) pacientes e $\geq 1,0$ cm em 19 (35,8%). O tipo histológico do adenoma era tubular em 49 (69%) e tubuloviloso em 22 (31%). Atipias moderadas foram encontradas em 39 (55%) pacientes, adenomas e atipias leves foram observadas em 32 (45%).

A expressão de proteína betacatenina no CCR estava significativamente maior ($p < 0,001$) do que em adenomas e na mucosa não neoplásica adjacente. O aumento da expressão de betacatenina ocorreu principalmente no citoplasma das células, mas a coloração nuclear também foi significativa. Nos adenomas, a coloração da betacatenina foi significativamente mais baixa ($p < 0,0001$) do que na mucosa não neoplásica adjacente (Tabela 1).

A imunorreatividade da APC no CCR mostrou-se significativamente mais alta ($p < 0,0001$) do que no adenoma. A imunorreatividade da proteína de APC na mucosa não neoplásica adjacente mostrou-se significativamente mais alta ($p < 0,0001$) do que no adenoma. Não houve diferença significativa ($p = 0,24$) entre a imunorreatividade da proteína de APC no CCR nem em sua mucosa não neoplásica adjacente.

A imunorreatividade da proteína de GSK3 β mostrou-se significativamente mais baixa no CCR e na mucosa não neoplásica adjacente ($p = 0,03$ e $p = 0,0005$,

Tabela 1. Coloração imuno-histoquímica de betacatenina, *adenomatous polyposis coli* glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), axina 1 e ubiquitina em carcinoma colorretal, mucosa não neoplásica adjacente e adenoma colônico

Proteína	Intensidade da coloração imuno-histoquímica	CCR n (%)	Mucosa não neoplásica adjacente n (%)	Adenoma n (%)	Valor de p
Betacatenina		50 (78,1)	44 (68,7)	53 (74,6)	$<0,001^*$ (tumor versus adenoma)
	Forte	37 (74,0)	22 (50,0)	8 (15,1)	$<0,001^*$ (tumor versus mucosa) $<0,0001^*$ (adenoma versus mucosa)
APC	Reduzida	13 (26,0)	22 (50,0)	45 (84,9)	
		42 (65,6)	42 (65,6)	53 (74,6)	$<0,0001^*$ (tumor versus adenoma) 0,24, NS (mucosa versus tumor) $<0,0001^*$ (adenoma versus mucosa)
GSK3 β	Forte	38 (90,4)	41 (97,6)	24 (45,2)	
	Reduzida	4 (9,5)	1 (2,4)	29 (54,7)	
Axina 1		54 (84,4)	54 (84,4)	46 (70,4)	0,0005* (tumor versus adenoma) 1,00, NS (tumor versus adenoma) 0,0005* (adenoma versus mucosa)
	Forte	46 (85,2)	46 (85,2)	6 (13,1)	
Ubiquitina	Reduzida	8 (14,8)	8 (14,8)	40 (86,9)	
		61 (95,3)	49 (76,5)		0,04*
Ubiquitina	Forte	34 (55,7)	13 (26,5)		
	Reduzida	27 (44,3)	36 (73,4)		
Ubiquitina		48 (75,0)	48 (75,0)		0,3, NS
	Forte	18 (37,5)	29 (60,4)		
Ubiquitina	Reduzida	30 (62,5)	19 (39,6)		

* Significativa. CCR: carcinoma colorretal; NS: não significativo; APC: *adenomatous polyposis coli*.

respectivamente). Não houve diferença significativa ($p=1,00$) entre a imunorreatividade da proteína de GSK3 β no CCR e na mucosa não neoplásica adjacente.

A imunorreatividade da proteína axina 1 mostrou-se significativamente mais baixa ($p=0,039$) na mucosa não neoplásica adjacente. A expressão de ubiquitina mostrou diferença significativa ($p=0,03$) entre o CCR e a mucosa não neoplásica adjacente.

As expressões imuno-histoquímica da proteína betacatenina de APC, GSK3 β , axina 1 e ubiquitina em adenomas colorretais e CCR não mostraram diferenças significativas com características clinicopatológicas de CCR e adenoma do cólon.

DISCUSSÃO

Em humanos, a proteína betacatenina é codificada pelo gene CTNNB1, que está localizado em 3p22.1 (3,5). Hao et al.⁽⁶⁾ demonstraram uma expressão aberrante de mutações de betacatenina no CCR, e este é um evento precoce na carcinogênese colorretal humana. Eles verificaram que o epitélio normal adjacente a criptas aberrantes mostrou forte coloração de betacatenina, evento que também foi observado neste estudo no CCR e em sua mucosa não neoplásica adjacente, porém não em adenomas do cólon.

O gene da APC está localizado na posição 21q no cromossomo 5 e codifica uma proteína com diversos domínios funcionais que interagem com reguladores de proliferação e apoptose.^(11,12) O gene sofre mutação em 63% de adenomas esporádicos e em mais de 80% de CCR esporádico. A mutação heterozigótica é inerente em todos os casos de polipose adenomatosa familiar.⁽¹³⁻¹⁵⁾ A proteína de APC forma complexos moleculares capazes de eliminar a betacatenina intracitoplásmica, induzindo à sua degradação.^(1,4,12) No epitélio do intestino grosso, a expressão de APC é restrita a regiões em que a replicação celular cessou, e a diferenciação terminal foi estabelecida.⁽¹³⁾

No intestino grosso, mutações isoladas no gene da APC são suficientes para fornecer uma vantagem de crescimento seletivo, reduzindo a função do grau específico de APC suficiente para permitir a acumulação de betacatenina nuclear, promovendo a proliferação celular sem causar apoptose específica.^(2,3,12) Assim, já que o papel fisiológico da proteína APC é uma vantagem de crescimento, a perda de função promove uma expansão clonal celular.^(11,12) Quando a proteína APC sofre mutação, ela perde seu local de ligação na destruição do complexo da betacatenina, o que leva a um aumento da expressão da proteína betacatenina no citoplasma e núcleo.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

Li et al.⁽¹⁸⁾ examinaram a expressão de APC e proteínas mutadas em CCR, reguladores chave da betacatenina por imuno-histoquímica em pólipos serrilhados do lado direito. Esse estudo sugeriu que a forma molecular específica da betacatenina pode ter participação na ativação da sinalização Wnt de pólipos serrilhados do lado direito. Além disso, a perda da expressão da proteína mutada no câncer colorretal, mas não da expressão de APC, pode contribuir para a ativação precoce da sinalização de Wnt em pólipos serrilhados do lado direito. Neste presente estudo, a imunorreatividade reduzida da proteína APC não mutada foi observada na maioria dos pacientes com adenomas do cólon. Por outro lado, a presença significativa da proteína APC não mutada no CCR e na mucosa não neoplásica adjacente pode indicar que a proteína APC mutada não está envolvida como importante componente no processo da carcinogênese nesses tumores específicos. Wong et al.⁽¹⁹⁾ estudaram 758 casos de adenomas colorretais e concluíram que a conversão maligna de adenomas pode não estar relacionada apenas à mutação do gene de APC. Portanto, o desenvolvimento da carcinogênese colorretal, mesmo na ausência da proteína APC mutada, é possível, assim como sugeriram os resultados do presente estudo.

O gene da GSK3 β está localizado no cromossomo 19 na posição 13g.2. A GSK3 β é uma proteína multifuncional serina/treonina, capaz de fosforilar e inativar a glicogênio sintase.⁽²⁰⁾ A proteína GSK3 β age como chave inibidora na via de sinalização Wnt canônica.⁽²¹⁾ A expressão do gene GSK3 β atenua a proliferação de células CCR e leva à apoptose precoce.⁽²²⁾ Desse modo, sob condições fisiológicas, a GSK3 β fosforila e degrada fatores de transcrição de proteína e oncoproteínas, o que sugere que esta enzima seria um fator supressivo no desenvolvimento do tumor, que interfere negativamente na sinalização oncogênica.^(21,23) Também foi observado, no presente estudo, que a imunorreatividade da proteína GSK3 β mutada estava mais alta no CCR e na mucosa não neoplásica adjacente com relação ao adenoma de cólon.

A axina 1 apareceu como importante proteína *scaffold* para a regulação de uma variedade de vias de sinalização e funções biológicas.⁽²⁴⁾ O gene humano homólogo da axina 1 está localizado no cromossomo 16p13.3.⁽²⁵⁾ Em CCR esporádico, uma expressão aumentada da proteína axina sugere que a mutação do gene correspondente pode participar na carcinogênese colorretal.^(26,27) Assim, o presente estudo observou que a coloração da proteína GSK3 β mutada mostrou-se significativamente aumentada em comparação à mucosa não neoplásica adjacente.

A ubiquitina (E3 ubiquitina ligase) é uma proteína que recruta uma enzima conjugadora de ubiquitina E2,

que reconhece o substrato proteico e auxilia, ou diretamente catalisa a transferência da ubiquitina da conjugadora de ubiquitina E2 para o substrato proteico.⁽²⁸⁾ O gene humano homólogo está localizado no cromossomo 17p16.38.⁽²⁸⁾ Em tecidos normais, a betacatenina fosforilada é reconhecida pelo complexo E3 ubiquitina ligase, formando a poliubiquitina/betacatenina fosforilada, que é proteolisada pelo proteossoma.^(29,30)

Chen et al.⁽⁷⁾ observaram que a expressão da ubiquitina no CCR mostrou-se significativamente mais alta do que na mucosa não neoplásica adjacente, e esse resultado também foi encontrado no presente estudo. Além disso, esses autores não observaram relação significativa entre a expressão da proteína ubiquitina e as características clinicopatológicas do CCR, um achado que foi confirmado neste presente estudo.

CONCLUSÃO

No câncer colorretal, a expressão da proteína betacatenina mostrou-se aumentada no citoplasma e no núcleo da célula neoplásica, em comparação ao adenoma de cólon. A proteína *adenomatous polyposis coli* foi alterada principalmente em adenomas, e isso, junto do aumento de GSK3 β , axina 1 e proteínas ubiquitinas mutadas no câncer colorretal, pode prevenir a fosforilação da betacatenina pelo complexo destruidor e sua subsequente degradação no proteossoma. Esse evento permite que a proteína betacatenina estabilizada se desloque para o núcleo da célula, no qual ela pode ativar fatores de transcrição, bem como a expressão e a ativação de genes alvo relacionados à carcinogênese colorretal. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar se a constante atividade de vias de sinalização é necessária para tecidos normais e neoplásicos, e se essas condições diferem o suficiente para requererem intervenção terapêutica.

REFERÊNCIAS

- Xue B, Dunker AK, Uversky VN. The roles of intrinsic disorder in orchestrating the Wnt-pathway. *J Biomol Struct Dyn*. 2012;29(5):843-61.
- Humphries A, Cereser B, Gay LJ, Miller DS, Das B, Gutteridge A, et al. Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(27):E2490-9.
- van Veelen W, Le NH, Helvensteijn W, Blonden L, Theeuwes M, Bakker ER, et al. β -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut*. 2011;60(9):1204-12.
- White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012;142(2):219-32. Review.
- Kanczuga-Koda L, Wincewicz A, Fudala A, Abrycki T, Famulski W, Baltaziak M, et al. E-cadherin and β -catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2014;7(6):1863-70.
- Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, Pretlow TP. Beta-catenin expression is altered in human colon aberrant crypt foci. *Cancer Res*. 2001;61(22):8085-8.
- Chen D, Dou QP. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Curr Protein Pept Sci*. 2010;11(6): 459-70. Review.
- Schmit SL, Figueiredo JC, Cortessis VK, Thomas DC. The influence of screening for precancerous lesions on family-based genetic association tests: an example of colorectal polyps and cancer. *Am J Epidemiol*. 2015;182(8):714-22. Erratum in: *Am J Epidemiol*. 2016;183(3):248.
- Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):537-44. Review.
- Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):417-24.
- Kim TM, An CH, Rhee JK, Jung SH, Lee SH, Baek IP, et al. Clonal origins and parallel evolution of regionally synchronous colorectal adenoma and carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(29):27725-35.
- Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG, Maurice MM. Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer*. 2011;10:101. Review.
- Ogata DC, Greca FH, Luz Mde A, Ioshii SO, Tomasich FD. [Aberrant crypt foci and cancer of the colorectal junction: the correlation between beta-catenin/Ki-67 expression and the occurrence of early microscopic secondary lesions surrounding periphery colorectal cancer]. *Rev Col Bras Cir*. 2010;37(2):114-20. Portuguese.
- Cheng TH, Gorman M, Martin L, Barclay E, Casey G; Colon Cancer Family Registry; CGEMS, Saunders B, Thomas H, Clark S, Tomlinson I. Common colorectal cancer risk alleles contribute to the multiple colorectal adenoma phenotype, but do not influence colonic polyposis in FAP. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(2):260-3.
- Yamulla RJ, Kane EG, Moody AE, Politi KA, Lock NE, Foley AV, et al. Testing models of the APC tumor suppressor/ β -catenin interaction reshapes our view of the destruction complex in Wnt signaling. *Genetics*. 2014;197(4):1285-302.
- Rubio CA, Kaufeldt A, Koha R, Ushoida M, Lindahl J, Kis LL. β -catenin helices in the cytoplasm of sessile serrated adenoma/polyps and conventional colorectal adenomas. *Anticancer Res*. 2015;35(2):929-34.
- Ahearn TU, Shaikat A, Flanders WD, Seabrook ME, Bostick RM. Markers of the APC/ β -catenin signaling pathway as potential treatable, preneoplastic biomarkers of risk for colorectal neoplasms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(6):969-79.
- Li L, Fu X, Zhang W, Xiao L, Qiu Y, Peng Y, et al. Wnt signaling pathway is activated in right colon serrated polyps correlating to specific molecular form of β -catenin. *Hum Pathol*. 2013;44(6):1079-88.
- Wong HL, Peters U, Hayes RB, Huang WY, Schatzkin A, Bresalier RS, et al. Polymorphisms in the adenomatous polyposis coli (APC) gene and advanced colorectal adenoma risk. *Eur J Cancer*. 2010;46(13):2457-66.
- Salim T, Sjölander A, Sand-Dejmek J. Nuclear expression of glycogen synthase kinase-3 β and lack of membranous β -catenin is correlated with poor survival in colon cancer. *Int J Cancer*. 2013;133(4):807-15.
- Wang HL, Hart J, Fan L, Mustafi R, Bissonnette M. Upregulation of glycogen synthase kinase 3 β in human colorectal adenocarcinomas correlates with accumulation of CTNNB1. *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10(1):30-6.
- Kim NH, Cha YH, Kang SE, Lee Y, Lee I, Cha SY, et al. p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle*. 2013;12(10):1578-87.
- Zhang H, Hou W, Wang HL, Liu HJ, Jia XY, Zheng XZ, et al. GSK-3 β -regulated N-acetyltransferase 10 is involved in colorectal cancer invasion. *Clin Cancer Res*. 2014;20(17):4717-29.
- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, et al. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 2012;149(6):1245-56.

25. Parveen N, Hussain MU, Pandith AA, Mudassar S. Diversity of axin in signaling pathways and its relation to colorectal cancer. *Med Oncol.* 2011;28 Suppl 1:S259-67. Review.
26. Gwak J, Hwang SG, Park HS, Choi SR, Park SH, Kim H, et al. Small molecule-based disruption of the Axin/ β -catenin protein complex regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Res.* 2012;22(1):237-47.
27. Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford TJ, Mieszczynek J, Bienz M. Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(5):1937-42.
28. Tauriello DV, Maurice MM. The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation. *Cell Cycle.* 2010;9(18):3700-9. Review.
29. Yan DW, Li DW, Yang YX, Xia J, Wang XL, Zhou CZ, et al. Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery. *Br J Cancer.* 2010;103(7):961-9.
30. Zhao S, Jiang T, Tang H, Cui F, Liu C, Guo F, et al. Ubiquitin D is an independent prognostic marker for survival in stage IIB-IIIC colon cancer patients treated with 5-fluoruracil-based adjuvant chemotherapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(4):680-8.