

Genética Aplicada ao Câncer de Mama

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali¹ • Prof. Dr. Enio Ferreira^{2,4}
 Profa. Dra. Alessandra Estrêla da Silva Lima^{2,3} • Profa. Dra. Angélica Cavalheiro Bertagnolli² • Profa. Dra. Cristina Maria de Souza²

A análise da expressão gênica de neoplasias vem despertando grande interesse dos pesquisadores nos últimos anos. Técnicas como FISH, CISH, Microarray, Mamma Print e Oncotype têm sido utilizadas na classificação de tumores, na avaliação prognóstica e preditiva, bem como na caracterização do potencial metastático e da influência hormonal e ambiental no desenvolvimento do câncer.

A detecção de pequenas mutações, translocações ou a identificação de amplificação gênica (por aumento do número de cópias de um determinado gene) pode ser avaliada a partir de pequenas seqüências de DNA complementares. Essas seqüências, denominadas *probes* ou sondas, se ligam a segmentos do DNA nuclear, processo caracterizado como hibridização, e pode ser utilizada em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina.⁽¹⁾

Dentre as técnicas utilizadas podemos destacar a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), na qual as sondas podem ser marcadas por substâncias fluorescentes, sendo possível visualizar o produto da reação em um microscópio de fluorescência.⁽²⁾ Outra técnica muito similar à FISH é a hibridização

cromogênica *in situ* (CISH), na qual a revelação é feita nos moldes da imunistoquímica, o que permite o arquivamento das lâminas na forma usual.⁽¹⁾ Estudos recentes, que utilizam FISH e CISH, têm permitido esclarecer os resultados observados em estudos imunistoquímicos de câncer de mama, principalmente em análises da amplificação gênica do cromossoma 17, responsável pela expressão do gene HER-2.⁽³⁻⁵⁾

Outra tecnologia molecular que tem impulsionado a pesquisa genômica do câncer está relacionada à análise de microarranjos de cDNA (em inglês *microarray*).

Um microarranjo de cDNA consiste em dezenas ou centenas de fragmentos (sondas) de DNA complementar (cDNA) ou oligonucleotídeos conhecidos, fixos a uma lâmina de vidro ou outro tipo de suporte



Divulgação

Profs. Drs. Angélica Cavalheiro Bertagnolli (à esq.), Enio Ferreira, Cristina Maria de Souza e Geovanni Dantas Cassali.

1 - Professor Adjunto do Departamento de Patologia Geral. Coordenador do Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG.

2 - Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG.

3 - Professora Assistente do Departamento de Patologia e Clínicas - EMEV/UFBA.

4 - Professor Adjunto da Faculdade Itabirana de Saúde - FUNCESI.

sólido (filtro de náilon) em um padrão ordenado.⁽⁶⁾ O RNA das amostras a serem testadas é extraído, convertido a cDNA e marcado com fluorocromos. Posteriormente, as amostras de cDNA são hibridizadas sobre os arranjos e a fluorescência emitida é detectada por scanner automatizado.⁽⁷⁾

A utilização desta técnica possibilita o estudo da expressão de centenas a milhares de genes em células e tecidos de interesse. A obtenção do perfil gênico dos tumores possibilita a identificação de diferentes subtipos de câncer de mama e adiciona novas perspectivas de prognóstico, diagnóstico, tratamento, prevenção, além de esclarecer muitos aspectos referentes aos mecanismos de seu desenvolvimento.⁽⁷⁻¹⁰⁾

Uma outra modalidade da tecnologia dos microarranjos é o microarranjo de tecidos (tissue microarray, TMA). As amostras obtidas para o TMA são provenientes de secções histológicas, das quais um pequeno cilindro de tecido é retirado e introduzido em um bloco receptor, que poderá conter até 1000 amostras histológicas diferentes.⁽¹¹⁾ O tissue microarray pode ser construído para ser utilizado em análises histológicas, imunistoquímicas, bem como na hibridização *in situ* (FISH e CISH).^(8,12,13) Com esta técnica é possível avaliar um único gene, porém em um grande número de amostras tumorais, acelerando estudos que buscam associações entre variações moleculares e aspectos clínico-patológicos.⁽¹³⁾

A tecnologia dos microarranjos fornece informações promissoras em relação ao diagnóstico e tratamento do câncer. Entretanto, diversas limitações nas etapas de seleção, obtenção e processamento das amostras e análise

A tecnologia dos microarranjos fornece informações promissoras em relação ao diagnóstico e tratamento do câncer

e validação dos dados obtidos precisam ser superadas para que o uso dos microarranjos faça parte da rotina diária dos laboratórios de patologia.⁽⁸⁾

O perfilamento gênico de tumores ainda possibilitou o desenvolvimento de testes para auxiliar o diagnóstico e a individualização do tratamento, a partir da caracterização de diferentes grupos de pacientes com comportamento biológico tumoral diverso^(10,14). Atualmente, três testes prognósticos foram validados para o câncer de mama e estão comercialmente disponíveis, o Oncotype DX (Genomic Health, Redwood City, California), o MammaPrint (Agendia BV, Amsterdam, Netherlands), e o H/I (AvariaDX, Carlsbad, California).⁽¹⁵⁾ Estudos iniciais confirmam a capacidade discriminatória prognóstica de tais testes⁽¹⁰⁾ que representam a introdução de novas tecnologias, baseadas na expressão gênica, na aplicação clínica.

O Oncotype DX, desenvolvido por Paik et al.⁽¹⁶⁾ nos EUA, apresenta como base a análise de um painel de 21 genes, através da técnica do RT-PCR, resultando em um escore de recorrência que varia de 0 a 100. A interpretação do escore obtido, se baixo (escore menor que 18), intermediário (escore maior que 18 e menor que 30) ou alto (escore

maior que 30) determina a probabilidade de recorrência do câncer de mama até dez anos do diagnóstico inicial e os possíveis benefícios de alguns tipos de quimioterapia.⁽¹⁵⁾ Sua utilização é preconizada em pacientes com neoplasia mamária em estágio I ou II, receptor de estrógeno positivo e sem comprometimento de linfonodo. Esse tipo de avaliação apresenta como grande vantagem a possibilidade de estudos retrospectivos, pois utiliza amostras de tumor de mama fixadas em formalina e incluídas em parafina.⁽¹⁷⁾

O MammaPrint foi validado na Europa por van't Veer et al.⁽¹³⁾ e avalia o grau de atividade de 70 genes em uma amostra de tecido fresco de tumor de mama removido cirurgicamente. Este teste utilizando o cDNA microarray como método de análise também gera um escore que determina se a paciente está sob alto ou baixo risco para disseminação do tumor nos próximos cinco a dez anos. Os pacientes cujos tecidos são elegíveis para análise MammaPrint devem ter até 61 anos, estágio I ou II e linfonodos negativos, com presença ou não da expressão do receptor de estrógeno.

A plataforma H/I identifica a expressão de dois genes (*HOXB13-IL17BR*), a partir da técnica do RT-PCR.⁽¹⁵⁾ A expressão alta e isolada do gene *HOXB13*, assim como a proporção elevada dos dois genes, indica recorrência, enquanto a elevada expressão do gene *IL17BR* pequena probabilidade de recorrência. O perfil das pacientes submetidas ao teste I/H inclui receptor de estrógeno positivo, linfonodo positivo ou negativo e indicação de tratamento com tamoxifeno.⁽⁴⁾ Cabe mencionar o BT teste, no qual, diferentemente dos testes anteriores citados que utilizam

fragmentos de tecidos neoplásicos, é realizada a análise da expressão de 37 genes no sangue periférico de pacientes com neoplasia mamária, possibilitando o estabelecimento de um tratamento mais efetivo.

Mais recentemente tem se tornado evidente que além das alterações em genes codificadores de proteínas, anormalidades em genes não codificadores também podem contribuir para a patogênese do câncer.⁽¹⁸⁾ Em particular, uma classe de pequenos RNAs celulares, denominados microRNAs (miRNAs), atua como agentes que podem levar à inibição traducional ou degradação do RNAm. Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais.⁽¹⁹⁾ Em câncer de mama já foi descrita associação dos miRNAs (microRNA-10b) com invasão e metástase.⁽¹⁸⁾ Este crescente campo de estudo dos miRNAs e câncer deve florescer nos próximos anos, já sendo considerado por alguns pesquisadores como o *Big Bang* do século XXI – a revolução do RNA.⁽²⁾

O entusiasmo criado pelo desenvolvimento de novas técnicas para análise molecular global de tumores fez com que alguns cientistas acreditassem na proximidade do fim da histopatologia e passassem a considerar as abordagens para o diagnóstico do tumor como um equivalente de métodos mágicos de adivinhação; contudo, o que nos aguarda não é a substituição de um grupo de técnicas por outro. Pelo contrário, o diagnóstico e o prognóstico mais exato do câncer serão obtidos a partir de uma combinação de técnicas morfológicas e moleculares.⁽¹⁷⁾ ♦

Mais recentemente tem se tornado evidente que além das alterações em genes codificadores de proteínas, anormalidades em genes não codificadores também podem contribuir para a patogênese do câncer

REFERÊNCIAS

1. Madrid MA, Lo RW. Chromogenic *in situ* hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/*neu* status. *Breast Cancer Research*. 2004;6:593-600.
2. Li LC et al. Hitting the on switch. *Nature* 2007;448:855-858.
3. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kroberger C. Chromogenic *in situ* hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER-2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Laboratory Investigation* 2002;82:1007-1014.
4. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004;5:607-16.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Elsevier, 2005, 1.592 p.
6. Jayapal M, Melendez AJ. DNA microarray technology for target identification and validation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006;33:496-503.
7. Nagahata T, Onda M, Emil M. Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. *Cancer Science* 2004;95(3):218-225.
8. Cassali GD, Bertagnoli AC, Silva AE, Ferreira E. Microarrays em câncer de mama. *Prática Hospitalar* 2007;9(51):31-33.
9. Jeffrey SS, Fero MJ, Borresen DA, Botstein D. Expression array technology in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Molecular Interventions* 2002;2:101-109.
10. Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;2:151-157.
11. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001;81:133-138.
12. Fejzo MS, Slamon DJ. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins. *Am J Pathol* 2001;159:1645-1650.
13. Van't Veer LJ, Dai HY, Van De Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536.
14. Couzin J. Diagnostics: amid debate, gene-based cancer test approved. *Science* 2007;319:924-924.
15. Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC et al. Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Annals of Internal Medicine*. 2008;148(5):358-369.
16. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
17. Kaklamani V. A genetic signature can predict prognosis and response to therapy in breast cancer: oncoType DX. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2006;6:803-809(7).
18. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Review of: tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449(7163):682-688.
19. Filho JCMR, Kimura ET. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(6):1102-1107.
20. Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC, Marinopoulos S, Parmigiani G, Bass ED et al. Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann Intern Med* 2008;148:358-369.
21. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(23):3726-34.
22. Summersgill B, Clark J, Shipley J. Fluorescence and chromogenic *in situ* hybridization to detect genetic aberrations in formalin-fixed paraffin embedded material, including tissue microarrays. *Nat Protoc* 2008;3:220-234.
23. Whitehurst MM, Aldenderfer PH, Sooy MM, Strelkauskas AJ. Evaluation of the BT-1 serum assay for breast cancer. *Human Antibodies* 1999;9(3):155-60.
24. Zhao J, Wu R, Au A et al. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic *in situ* hybridization (CISH). In: *Archival Breast Carcinoma*. *Mod Pathol* 2002;15:657-665.
25. ZYMED. Zymed® Spot-Light® CISH™ Probes and CISH™ Detection. South San Francisco, 2005.

Endereço para correspondência:

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Patologia Geral - Laboratório de Patologia Comparada Av. Antônio Carlos, 6.627 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte - MG.