

ARTIGO DE REVISÃO

Análise Genômica: do laboratório à prática oncológica Genome Analysis: from laboratory to oncology practice

Marileila Varella-Garcia, PhD

Professor in Medicine, Department of Medicine, Medical Oncology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver Colorado, USA.

Resumo O câncer é uma doença complexa e heterogênea caracterizada por numerosas alterações genéticas e epigenéticas. Os avanços recentes nas pesquisas com o genoma humano e no desenvolvimento de tecnologia de ponta têm contribuído significativamente para o entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações tumorigênicas, oferecendo novas aplicações clínicas. Em um curto período de tempo, já se pode notar a contribuição promissora nas áreas de diagnóstico, prognóstico e terapia em oncologia. Nesta revisão são destacados recentes resultados de estudos envolvendo microarranjos de DNA e terapia molecular, e discutidos possíveis problemas e perspectivas da aplicação desses novos conhecimentos laboratoriais à prática oncológica.

Palavras-chave Câncer, Análise genômica, Microarranjos de DNA, Terapia molecular

Abstract Cancer is a highly complex and heterogeneous disease characterized by the accumulation of genetic and epigenetic changes. Recent advances in human genome research and development of high-throughput technologies have shed light into the understanding of the molecular mechanisms involved in tumorigenesis and opened a new window of opportunities for research in oncology. In a short period of time, there has been a promising contribution to the diagnosis, prognosis and therapy. In this review, we highlight recent developments in microarray technology and molecular target therapy, and comment on potentially problematic areas and further trends for applications.

Keywords Cancer, Genome analysis, DNA-microarrays, Molecular therapy

O câncer é uma doença bastante heterogênea e as múltiplas alterações genéticas e epigenéticas causam problemas significativos para sua prevenção, diagnóstico e terapia. Estudos celulares funcionais são críticos para decifrar a complexidade da doença, esclarecer a base biológica e propiciar a identificação das melhores estratégias terapêuticas. Além disso, para que haja um impacto significativo na saúde e qualidade de vida humana, a transferência dos achados laboratoriais para a prática médica deve ser feita de forma rápida. Contudo, a ligação entre o laboratório e a clínica é ainda bastante precária, porque os pesquisadores clínicos frequentemente vêem os estudos em modelos laboratoriais com ceticismo e os pesquisadores laboratoriais olham a pesquisa clínica com restrições. Nesta revisão são discutidos recentes avanços na pesquisa básica com efeito positivo no diagnóstico e terapia oncológica.

Perfil Molecular no Diagnóstico e Prognóstico dos Tumores

Uma das conquistas científicas mais importantes desta década foi o término do sequenciamento do genoma humano, que

permitiu a grande expansão de estudos funcionais ao nível genômico. Nos últimos anos, diversos métodos foram desenvolvidos para definição do perfil de expressão molecular e praticamente todos têm sido extensivamente usados na pesquisa em câncer. Entre esses métodos, a análise de microarranjos de DNA atingiu uma reputação ímpar porque o processo é relativamente simples, não requer sequenciamento de DNA em larga escala, e permite a quantificação simultânea de milhares de genes em numerosos espécimens.

A tecnologia de microarranjos baseia-se na hibridização entre seqüências de DNA-alvos, moléculas derivadas de um espécimen biológico que são marcadas por fluorocromos, e seqüências de DNA-sondas, moléculas que representam os genes de interesse e são imobilizados em uma matriz sólida (lâmina de sílica ou de vidro, substrato sólido de nylon). Os microarranjos podem ser encontrados em dois tipos de plataformas: uma com cDNA e outra com oligonucleotídeos como DNA-sonda. O microarranjo de cDNA é constituído por longas moléculas de DNA imobilizadas em uma superfície sólida e é freqüentemente usado para estudos de expressão gênica e em triagens com grande

número de espécimens. O microarranjo de oligonucleotídeos é constituído de seqüências curtas de DNA sintetizadas artificialmente e imobilizadas em matriz de vidro, e é comumente utilizado para detecção de mutações, mapeamento genético e estudos de expressão gênica. Os arranjos de oligonucleotídeos têm custo mais elevado, mas podem detectar alterações moleculares de menor porte, tanto quantitativa como qualitativamente.

Os estudos com microarranjos de DNA geram uma enorme quantidade de dados que requerem modelos matemáticos especiais para análise. A análise não-supervisionada define classes de tumores pelo agrupamento de genes ou espécimens com base nas semelhanças dos perfis de expressão gênica, sem qualquer organização inicial. Após a definição dessas classes, são então realizadas análises para associação com histologia, parâmetros clínicos e outros marcadores. A análise não-supervisionada tem um nível baixo de viés e é melhor adequada para revelar subtipos, até então, desconhecidos entre amostras. A análise supervisionada, por outro lado, incorpora outras informações relacionadas com as amostras para identificar grupos de genes que corretamente discriminem as variáveis sob investigação. Por exemplo, dados de sobrevivência podem ser incluídos no modelo para ajudar a identificar o perfil molecular que melhor se ajusta à classe de pacientes que respondem ao tratamento com determinada droga. Esse perfil é chamado "classificador molecular", e o grupo de tumores usado para sua definição é denominado "grupo de treinamento". Após sua definição, o classificador é validado no "grupo teste", um grupo independente de tumores do mesmo tipo, mas com subclassificação desconhecida. A análise supervisionada é melhor adequada à identificação prospectiva de tumores classificados em um subgrupo pré-definido. Tanto a abordagem supervisionada como a não-supervisionada são comumente aplicadas ao mesmo conjunto de dados com distintos objetivos.

A expressão gênica de tumores tem sido usada com sucesso como um instrumento para melhorar a precisão do diagnóstico e do prognóstico em oncologia¹⁻³. Por exemplo, análise não-supervisionada em câncer de mama tem consistentemente separado tumores com base na presença ou ausência da expressão do receptor de estrogênio (ER), ou na característica esporádica ou familiar do tumor^{4,5}. Perfis de expressão específicos foram identificados como previsores de resposta em pacientes com carcinomas de mama e pulmão sem contaminação de linfonodos^{6,7} e para identificar genes que se expressam diferencialmente em estágios iniciais ou avançados de tumores de células escamosas de esôfago⁸. Do mesmo modo, a tecnologia de microarranjos identificou níveis séricos de osteopontina e prostasina como marcadores para detecção precoce de câncer de ovário^{9,10}.

Como geralmente acontece com novas tecnologias, a normatização técnica para os microarranjos ainda é um problema. Há diferentes tipos de plataformas, diferentes grupos de genes são incluídos em cada uma delas, diferentes técnicas são usadas para hibridização, e os modelos para análise matemática estão em constante desenvolvimento. Conseqüentemente, ainda há muito a validar antes que esta técnica tenha plena utilidade clínica. Além disso, a grande variabilidade das circunstâncias clínicas também pode constituir um problema para a aplicabilidade dos microarranjos na prática diagnóstica. Por exemplo, um determinado perfil molecular pode indicar resposta favorável para terapia adjuvante em câncer de pulmão em estágio inicial, mas ser um fator prognóstico desfavorável em doença avançada. Contudo, num futuro não muito distante, espera-se que minichips contendo um número limitado de genes altamente prediti-

vos sejam utilizados para identificar subgrupos biológicos de tumores hematológicos ou de tecidos sólidos que sejam associados com prognósticos e terapias mais apropriadamente definidos.

Seleção de Alvos Moleculares para Terapia

A quimioterapia convencional muitas vezes oferece somente respostas parciais, temporárias e imprevisíveis. As terapias voltadas para mecanismos moleculares têm sido reconhecidas como mais efetivas em associar eficácia com níveis mais baixos de efeitos tóxicos. Contudo, os desafios oferecidos pelos aspectos práticos da terapia molecular são tão grandes como a esperança trazida pelos resultados dos estudos básicos. Um dos principais alvos destes estudos são as enzimas proteína-quinases, que transferem grupos fosfato do ATP para aminoácidos específicos de proteínas. A fosforilação dessas proteínas leva à ativação de redes de transmissão de sinais intracelulares que tem papel crítico em uma variedade de processos biológicos, como crescimento, diferenciação e morte celular. Algumas quinases fosforilam os aminoácidos serina e treonina, outras fosforilam o aminoácido tirosina. Como as proteína-quinases são frequentemente desreguladas e têm níveis de expressão significativamente aumentados em cânceres humanos, elas constituem alvos atraentes para inibidores farmacológicos específicos. Diversas drogas que inibem proteínas tirosina-quinases foram aprovadas ou estão em pendência para aprovação como terapêuticos em tipos diferentes de câncer¹¹.

Quando a doença tem um determinante molecular principal, existe uma alta probabilidade de sucesso no desenvolvimento de terapia-alvo efetiva. O melhor exemplo desta situação é a leucemia mielóide crônica (LMC), que tem o gene quimérico *BCR-ABL* gerado pela translocação entre os cromossomos 9 e 22. A proteína codificada por este gene quimérico é constitutivamente ativa e pode ser bloqueada, efetivamente, pelo *imatinib*, um inibidor de transdução de sinais intracelulares. O *imatinib*, inicialmente designado STI571 e manufaturado como Gleevec nos USA e Glivec em outras partes do mundo (Novartis), é um inibidor poderoso das proteína-quinases ABL e BCR-ABL. A ausência de fosforilação inibe o prosseguimento da sinalização celular e muda o balanço fisiológico para a redução da proliferação celular e aumento de apoptose. O *imatinib* induz respostas dramáticas e duráveis em pacientes com LMC, mesmo em casos refratários à terapia com interferon. Infelizmente, são raras neoplasias humanas, com determinantes moleculares primários e, na maioria dos tumores sólidos, a complexidade dos caminhos metabólicos interrelacionados representa um forte obstáculo à proposta das terapias moleculares alvo.

Curiosamente, o primeiro exemplo de receptor tirosina-quinase demonstrado como um alvo ideal para terapia anti-câncer foi o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*erb-B2* ou *HER2*), em câncer de mama¹². O *HER2* não tem um ligante, mas é o parceiro de dimerização preferido dos outros membros da família dos receptores de fatores de crescimento epidérmicos. Por mais de duas décadas, sabe-se que o *HER2* tem expressão elevada em cerca de 20% dos carcinomas mamários e esta expressão é correlacionada com prognóstico pior, provavelmente devido a aumento nas atividades de proliferação, sobrevivência celular, angiogênese, invasão e metástase¹³. A expressão aumentada de *HER2*, tipicamente como consequência de amplificação gênica, resulta em alteração de resposta a manipulações hormonais através do complexo do receptor de estrogênio (ER) e em aumento na regulação do fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF). A importância clínica do *HER2* em câncer mamário serviu de base para o desenvolvimento de drogas específicas contra este receptor, entre elas o anticorpo monoclonal humanizado *trastuzumab* (Herceptin). Em estudos clínicos randomizados, as pacientes com tumores de mama metastáticos que eram *HER2*-positivos sobreviveram por mais tempo quando tratadas com *trastuzumab* em combinação com quimioterapia do que quando tratadas somente com quimioterapia¹². É interessante destacar que a pesquisa também foi efetiva em reconhecer que os efeitos adversos da cardiomiopatia congestiva associados a tratamento com doxorubicina e *trastuzumab* eram devidos ao efeito anti-apoptótico do *HER2* em miócitos normais¹⁴.

Outro exemplo interessante relaciona o *imatinib* com tumores de estroma gastrointestinal (GISTs). O *imatinib* havia sido identificado, em estudos pré-clínicos, como eficiente inibidor de outras quinases, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o *c-KIT*. Este efeito em *c-KIT* levou a testar esta droga como um alvo terapêutico nos GISTs, os tumores mesenquimais do trato gastrointestinal mais comuns. Esses tumores, que notoriamente não-respondem à quimioterapia convencional, frequentemente apresentam mutações nos éxons 9, 11, 13 do gene *c-KIT*, mutações essas que são responsáveis por ganho funcional devido a ativação constitutiva do receptor¹⁵. O gene *c-KIT* codifica uma proteína que se localiza na membrana celular e a homodimerização de duas dessas moléculas adjacentes ativa o domínio quinase, com conseqüente ativação de cascatas sinalizadoras envolvidas em tumorigênese, como a proliferação celular, adesão, apoptose e diferenciação. Pesquisas recentes aprovaram o *imatinib* como a primeira terapia sistêmica efetiva para GIST metastático e localmente ressecável. O efeito clínico deste agente anti-câncer é geralmente rápido e os sintomas relacionados se reduzem poucos dias após o início do uso da droga¹⁵. Estudos atuais visam verificar por quanto tempo o paciente teria que ser tratado e quais seriam as conseqüências de um tratamento à longo prazo.

A identificação de alvos terapêuticos moleculares efetivos é especialmente necessária para câncer de pulmão, o tumor sólido mais letal nos países ocidentais, geralmente metastatizado por ocasião do diagnóstico. Entre as proteínas com níveis elevados de expressão em carcinomas pulmonares de células não escamosas (NSCLC), está o receptor do fator de crescimento epidérmico (HER1 ou EGFR). A sinalização pelo EGFR é complexa, envolvendo homo e heterodimerização com outros membros da família (HER2, HER3 e HER4). Recentemente foram desenvolvidas pequenas moléculas que inibem a fosforilação do EGFR, competindo seletivamente ao nível do sítio de ligação ATP-tirosina-quinase. Entre elas destaca-se o *gefitinib* (ZD1839, Iressa, AstraZeneca), um derivativo da quinazolina que obteve licença para uso em NSCLC avançado em numerosos países, incluindo Estados Unidos e Japão. Contudo, em estudos clínicos fases II e III, o *gefitinib* induziu uma redução tumoral dramática, mas em apenas cerca de 10% dos pacientes com NSCLC.

Mais recentemente, investigações moleculares encontraram importantes previsores biológicos de sensibilidade ao *gefitinib* em pacientes com carcinoma pulmonar. Em uma conquista espetacular da medicina molecular, Paez et al.¹⁶ e Lynch et al.¹⁷ descobriram que tumores de pacientes que responderam ao tratamento com *gefitinib* apresentavam mutações no gene *EGFR*. As mutações, representadas por substituição ou deficiência de algumas bases nitrogenadas, concentravam-se no sítio cataliticamente ativo do receptor quinase (éxons 18 a 23), onde o *gefiti-*

nib se liga. Esses achados sugeriram que tais mutações eram fatores determinantes do crescimento do câncer pulmonar, e que a inibição da atividade do EGFR pelo medicamento destruía as células cancerosas portadoras de mutações. Em experimentos *in vitro*, os receptores mutantes sinalizavam continuamente em resposta ao ligante EGF. Portanto, parece que enquanto estas mutações conferem vantagem de crescimento às células tumorais, elas também tornam esses tumores mais suscetíveis ao *gefitinib*. Paez et al.¹⁶ detectaram tais mutações, mais frequentemente, no gene *EGFR* em pacientes japoneses do que em norte-americanos. Estes achados são interessantes, porque estudos clínicos haviam mostrado que pacientes japoneses são três vezes mais responsivos ao *gefitinib* do que os norte-americanos. As mutações são também mais comuns em pacientes do sexo feminino não-fumantes e com tumores com padrão histológico de adenocarcinoma, características que haviam sido previamente associadas com maior probabilidade de responder a esta droga.

Ao mesmo tempo, nosso grupo da Universidade do Colorado identificou outro marcador molecular de resposta ao tratamento com *gefitinib*, na presença de um número aumentado de cópias do gene *EGFR* nas células tumorais¹⁸. Usando testes de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), os tumores foram classificados em *EGFR*-negativos, quando não apresentavam ganho no número de cópias do gene por célula ou haviam ganho em nível baixo, e *EGFR*-positivos, quando os tumores tinham ganho elevado no número de genes, associados com polissomia do cromossomo 7 ou amplificação gênica. Os pacientes *EGFR*-positivos apresentaram índices significativamente aumentados de resposta ao tratamento (36% versus 3%) e de controle da progressão da doença (67% versus 26%), assim como um prolongamento significativo do tempo de estabilidade clínica (mediana 9 meses versus 2,5 meses) e sobrevida (18,7 meses versus 7,0 meses). Em análise multivariada, o número elevado de cópias do gene *EGFR* foi identificado como um fator significativo e independentemente associado com resposta ao tratamento e sobrevida. Em uma análise preliminar com número reduzido de pacientes, foi verificado que a maioria dos que responderam ao inibidor do *EGFR* era portador de uma das mutações críticas e tinha elevado número de cópias do alelo mutado. Esses resultados indicam que a avaliação do número de cópias do gene por célula tumoral seja usada como um parâmetro para selecionar os pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas que têm alta probabilidade de responder ao *gefitinib*.

Apesar deste importante progresso, ainda restam questões polêmicas nesta área, como a identificação dos mecanismos de desenvolvimento de resistência. Os estudos em LMC e *imatinib* sugerem que inúmeros mecanismos moleculares podem ser importantes. Curiosamente, a resistência ao *imatinib* por pacientes com LMC é determinada por amplificação gênica e mutações sem sentido no sítio do domínio quinase que se liga à droga¹⁹, os mesmos mecanismos que tornam os pacientes com câncer de pulmão suscetíveis ao *gefitinib*.

Devido à proteína EGFR e outros membros da família apresentarem níveis elevados de expressão em diversos outros carcinomas humanos, é importante investigar se esses tumores também são portadores de mutações amplificadas e, portanto, candidatos ao tratamento com *gefitinib*. A identificação de um subgrupo de pacientes mais propícios a responder ao tratamento, reduz o número de casos a serem incluídos em subseqüentes estudos clínicos e os custos operacionais, sem perder o poder estatístico.

Conclusão

Inúmeros testes moleculares estão sendo atualmente introduzidos na prática oncológica, e eles fornecem grande quantidade de dados úteis dos pontos de vista clínico e biológico. Grande parte desta informação é usada no refinamento de diagnósticos específicos porque fornece dados importantes que não são compreendidos de outros tipos de testes. Entretanto, apesar das aplicações dos estudos genômicos serem bastante promissoras, é crítico reconhecer as possíveis falhas e limitações, assim como é necessário integrar a análise molecular no contexto patológico e clínico adequado para otimizar o seu valor.

Estamos vivendo uma época de oportunidades e desafios sem precedentes para a aplicação da pesquisa básica na clínica oncológica. Apesar da enorme quantidade de recursos disponí-

veis, é difícil cobrir todos os problemas logísticos desta complexa interface. Os estudos pré-clínicos devem examinar linhagens celulares ou modelos animais ou agentes com associação relevante com a doença, as drogas devem ser testadas em concentrações clinicamente relevantes, e os fenômenos biológicos devem ser complementados com técnicas mais refinadas. Os estudos clínicos devem ser planejados com base em dados pré-clínicos ou clínicos preliminares e incluir aquisição prospectiva de amostras biológicas para subseqüentes análises, ter poder estatístico para fornecer um sinal clínico adequado, e serem conduzidos de forma a poder demonstrar reprodutibilidade. Felizmente, excelentes exemplos de aplicação da pesquisa laboratorial à prática oncológica têm sido publicados, e em frequências cada vez maiores.

Referências bibliográficas

- Bertucci F, Viens P, Tagget R, Nguyen C, Houlgatte R, Birnbaum D. DNA arrays in clinical oncology: promises and challenges. *Lab Invest* 2003;83:305-16.
- Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene* 2003;22:6497-507.
- Putszai L, Ayers M, Stec J, Hortobagyi GN. Clinical application of cDNA microarrays in oncology. *Oncologist* 2003;8:252-8.
- Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression pattern. *Cancer Res* 2001;61:5979-84.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
- Beer DG, Kardias SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE. Gene expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinomas. *Nat Med* 2002;8:816-24.
- Lu J, Liu Z, Xiong M, Wang Q, Wang X, Yang G, et al. Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *Int J Cancer* 2001;91:288-94.
- Mok SC, Chao J, Skates S, Wong K, Yiu GK, Muto MG, et al. Prostin, a potential serum marker for ovarian cancer: Identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1458-64.
- Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, et al. Osteopontin as a potential diagnostic marker for ovarian cancer. *JAMA* 2002;287:1671-9.
- Ranson M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 2004;90: 2250-5.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
- Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hubner N, et al. Conditional mutation of erbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8880-5.
- Connolly EM, Gaffney E, Reynolds JV. Gastrointestinal stromal tumours. *Br J Surgery* 2003;90: 1178-86.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
- Cappuzzo F, Hirsch F, Rossi E. Increased EGFR gene copy numbers predicts outcome to gefitinib in advanced non-small cell lung carcinoma. *In Press*.
- Yoshida C, Medlo JV. Biology of chronic myeloid leukemia and possible therapeutical approaches to imatinib resistance. *Int J Hematol* 2004;79:420-33.

Correspondência

Marileila Varella-Garcia

email: marileila.garcia@uchsc.edu
