Inovar saúde

Revista Médica

Grupo DASA

Outubro 2017

Edição Especial

GENEONE
Medicina de precisão.

ONCOGENÉTICA

Inovar saúde DIGITAL

Leia aqui a versão **on-line** da revista

Nesta edição especial, você encontrará artigos científicos referentes à área da oncogenética

Grupo

DASA

Grupo DASA

Presidente do Conselho:
Dr. Romeu Cortes Domingues
Presidente DASA:
Pedro Bueno

Inovar saúde
Revista Médica

Conselho Editorial:
Dr. Emerson Gasparetto – Vice-presidente médico
Dr. Leonardo Vedolin – Diretor Médico de RDI
Dr. Gustavo Aguiar Campana – Diretor Médico de Análises Clínicas SP
Dra. Monica Freire – Diretora Médica de Análises Clínicas RJ
Dra. Natasha Slhessarenko Fraife Barreto – Diretora Médica de Análises Clínicas CO
Dra. Claudia Cohn – Diretora de Atendimento e Mercado Premium
Ricardo Medina – Diretor de Marketing
Alexandre Cifarelli – Gerente de Marketing
Pedro Henrique Ribeiro Quevedo – Gerente de Marketing
Bianca Godinho Maria – Analista de Marketing
Tábita Araújo Faber – Analista de Marketing

Participaram desta edição:
Dr. Cristovam Scapulatempo Neto
Dra. Elizabeth Xisto Souto
Dra. Flora Finguerman
Dr. Gustavo Guida
Dra. Ilana Zalcberg Renault
Dr. José Eduardo Levi
Dra. Lucia Monteiro de Castro Lima
Dra. Michele Migliavacca
Dra. Shweta Dhar

Tiragem: 2.500

www.dasa.com.br
revistainovarsaude@dasa.com.br

Grappa Marketing Editorial
Diretoria: Adriano De Luca
Juliano Guarany De Luca
Editor: Adriano De Luca (Mtb.: 49.539)
Arte: Paula Cristina d'Andréa
Redação: Suênia Cardoso
Revisão: Jaqueline Couto

contato@grappa.com.br
www.grappa.com.br

Fotos: Alessandro Mendes e Sergio Zacchi

Responsável técnico:
Dr. Gustavo Campana (Cremesp 11218)

GENEONE
Medicina de precisão.

Prezados leitores,

SER A 4ª MAIOR EMPRESA DE MEDICINA DIAGNÓSTICA DE TODO O MUNDO E A MAIOR DA AMÉRICA LATINA traz imensas responsabilidades. Liderança em inovação, qualidade e a garantia de acesso aos procedimentos diagnósticos atuais para os pacientes são foco de investimento e desenvolvimento da área médica da DASA.

Sabemos, entretanto, que os exames diagnósticos de alta complexidade, como os exames genéticos, possuem particularidades operacionais, analíticas e de controle de qualidade que devem ser prioridades na prática médica para entregarmos uma medicina de qualidade e, principalmente, segurança aos nossos pacientes e aos clientes médicos e laboratórios que compartilham seus diagnósticos conosco, nos referenciando.

Nossa preocupação está traduzida no lançamento de uma nova marca dedicada à realização da medicina genômica. A GENEONE já nasce com um corpo clínico especializado e diferenciado, com ampla capilaridade oferecida pelo Grupo DASA e com alta diversidade de metodologias em genômica. Estamos prontos para oferecer e suportar o diagnóstico genético nas Doenças Hereditárias, Doenças Infecciosas e na Oncogenética por todo o mundo.

Iniciamos a GENEONE oferecendo um portfólio extenso, com cobertura dos procedimentos presentes no Rol da Agência Nacional de Saúde e com diversos testes relacionados ao diagnóstico oncológico, para avaliação somática e germinativa de genes relacionados às neoplasias. Já definimos um plano importante de desenvolvimento de novos exames, garantindo que nosso portfólio seja crescente e alinhado às necessidades clínicas e evolução da Medicina Personalizada.

A área da genômica, em especial a oncogenética - campo da genética que estuda a biologia molecular dos tumores -, é um dos campos da medicina que mais evoluiu nos últimos anos, tanto do ponto de vista diagnóstico como, e ainda mais, na efetividade terapêutica. Uma das principais evoluções é o advento da utilização da terapêutica alvo nas neoplasias, isto é, o uso de medicamentos direcionados para os pacientes portadores de determinadas variantes genéticas, dado que a efetividade terapêutica está relacionada à oncogenética.

Esta edição especial da **Revista Inovar Saúde – Oncogenética**, foi pensada especialmente para o XX Congresso Brasileiro de Oncologia Clínica, com atualizações importantes sobre a área.

A GENEONE é um importante passo de nossa empresa para alcançarmos o nosso sonho:

Seremos a LÍDER GLOBAL DE MEDICINA DIAGNÓSTICA, a empresa mais desejada e admirada pela QUALIDADE MÉDICA, EFICIÊNCIA E EXCELÊNCIA EM SERVIÇOS, atuando com paixão para melhorar a vida das pessoas.

Boa leitura!

Dr. Romeu Côrtes Domingues
Presidente do Conselho

Dr. Emerson Gasparetto
Vice-Presidente Médico

Dr. Gustavo Campana
Diretor Médico de Análises Clínicas

Sumário

6 **Oncologia**
Medicina personalizada e câncer: Os avanços na oncogenética
Dra. Ilana Zalcberg Renault

11 **Oncologia**
Genética molecular aplicada ao câncer hereditário
Dr. Gustavo Guida, Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dra. Shweta Dhar

19 **Mastologia**
Genética do câncer de mama
Dra. Ilana Zalcberg Renault

25 **Genética Médica**
A evolução da citogenética molecular
Dra. Michele Migliavacca

29 **Oncogenética**
Abordagem laboratorial integral na onco-hematologia – neoplasias mieloides: Parte 1
Dra. Ilana Zalcberg Renault, Dra. Lucia Monteiro de Castro Lima e Dra. Elizabeth Xisto Souto

35 **Oncogenética**
Câncer de pulmão: Paradigmas terapêuticos da doença
Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

40 Neurologia Pediátrica – Pediatria – Genética
Testes genéticos de avaliação de transtorno global do desenvolvimento
Dr. Gustavo Guida

43 Oncologia Clínica, Neurologia e Neurocirurgia
A genética e as neoplasias encefálicas
Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

47 Oncologia Clínica, Neurologia e Neurocirurgia
Câncer de mama e ovário hereditários
Dra. Ilana Zalcberg Renault, Dr. Cristovam Scapulatempo Neto e Dra. Flora Finguerman

51 Oncologia
TARGET ONE PAN CANCER™
Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

55 Oncologia
Biópsia líquida: O estado da arte e a atual aplicabilidade clínica
Dr. José Eduardo Levi

Dra. Ilana Zalcberg Renault*

Medicina personalizada e câncer: Os avanços na **oncogenética**

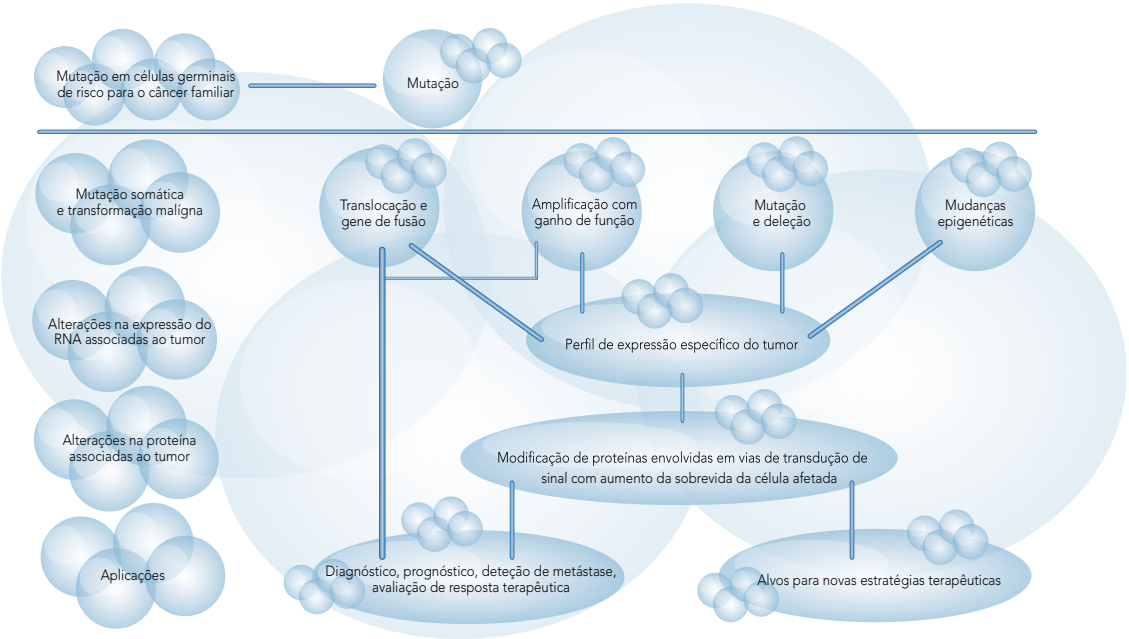
Genética Médica evolui por meio de avanços no diagnóstico para permitir o tratamento individualizado a cada paciente com base em sua doença específica

EMBORA O USO DA GENÉTICA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA AINDA NÃO TENHA ALCANÇADO SEU ÁPICE, um progresso substancial tem sido observado. A Genética Médica, que até pouco tempo era utilizada como uma ferramenta para diagnosticar um número relativamente pequeno de doenças raras e herdadas de forma Mendeliana simples, sofreu recentemente uma grande expansão possibilitando sua aplicação a previsões sobre o risco de desenvolvimento de doenças mais complexas como o câncer. Esse desenvolvimento foi possível a partir de alguns fatores, como o sequenciamento do genoma humano, os estudos de associação genômica (GWA) para identificação de variações pontuais na sequência de DNA (polimorfismos, SNPs) associados à suscetibilidade a uma determinada doença e o desenvolvimento de tecnologias genômicas de 2ª geração.

É cada vez mais evidente que o diagnóstico molecular apresenta um papel central para: determinação da suscetibilidade de um indivíduo ao câncer; detecção precoce da doença; definição diagnóstica; estabelecimento prognóstico; escolha terapêutica; avaliação da efetividade da resposta terapêutica; detecção de doença residual ou recidiva precoce e predição de toxicidade e resistência terapêutica (Figura 1).

> "É possível que nenhuma outra área do conhecimento tenha gerado tanta informação como os dados resultantes da análise dos mecanismos moleculares do câncer. Embora ainda existam ambiguidades em alguns resultados de sequenciamentos gênicos ("variantes de significado desconhecido"), a detecção de uma mutação familiar em um paciente pode levar à opção de realização de testes com alta sensibilidade e especificidade pelos familiares para determinação da presença da mesma mutação"

Figura 1. Mecanismos moleculares de transformação maligna no diagnóstico, prognóstico e avaliação da resposta terapêutica

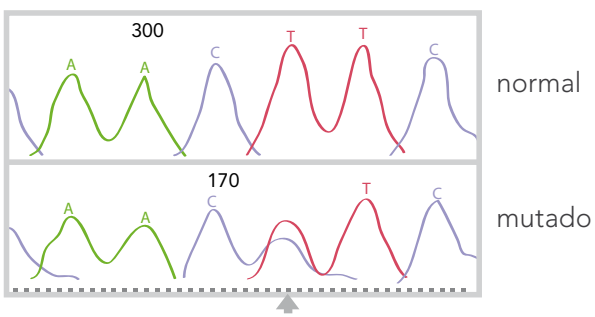


A expectativa atual é que a genética molecular permitirá o estabelecimento de um tratamento médico individualizado a cada paciente baseado no conhecimento específico de sua doença e na identificação de alvos terapêuticos de acordo com o genótipo, pois uma grande heterogeneidade na evolução clínica e na resposta terapêutica é observada em grupos de pacientes diagnosticados com um mesmo subtipo de um determinado tumor.

A predisposição genética hereditária ao câncer pode estar associada à mutação de um único gene. Nesses casos, os genes envolvidos são de alta penetrância e os indivíduos afetados apresentam um alto risco para o desenvolvimento de câncer em idades precoces.

A detecção molecular de mutações herdadas pode ser realizada em uma amostra de sangue colhida de um indivíduo com história familiar de câncer – e por Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) – que identifique alterações na ordem dos nucleotídeos de sua amostra (Figura 2). O sequenciamento é utilizado para detecção de mutações, deleções e inserções. Atualmente é associado à técnica MPLA (para detecção de grandes deleções e inserções) e Arrays-CGH (para detecção de rearranjos genômicos).

Figura 2. Visualização da variante c.2311 T>C na região codificante de BRCA1



Fish utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência.

CÂNCER DE MAMA – BIOMARCADORES

O aumento do número de cópias do gene HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico) detectado por FISH nas células tumorais está associado a um fenótipo mais agressivo. A utilização de terapia alvo-específica para HER2, o anticorpo anti-HER-2, combinado à quimioterapia, minimiza o valor prognóstico adverso da amplificação de HER2 aumentando em 50% a taxa de resposta.

Em contraste, o Tamoxifeno é o tratamento de escolha para outros subtipos de câncer de mama. A detecção de positividade para o receptor de estrogênio e a amplificação de HER2 refletem o valor de uma escolha terapêutica baseada em um marcador molecular.

ESCOLHA TERAPÊUTICA NO CÂNCER NÃO FAMILIAR

A aplicação da biologia molecular nos cânceres esporádicos tem tido larga utilização. Nesses casos, o conhecimento das alterações genéticas somáticas e epigenéticas de um tumor permitem a confirmação ou mesmo a definição do diagnóstico clínico, que se dará pela identificação de biomarcadores que refletam alterações correlacionadas à doença e sejam específicos a cada subtipo de câncer. Essa identificação irá, em muitos casos, orientar o direcionamento terapêutico, inclusive antecipando a reação de um paciente a um determinado medicamento, estabelecer o prognóstico e avaliar a resposta terapêutica, mediante acompanhamento periódico.

Dentre os diferentes biomarcadores, merecem destaque os chamados preditivos. Normalmente associados a medicamentos alvo-específicos, sua detecção irá predizer o efeito terapêutico de um determinado medicamento. A indústria farmacêutica tem trabalhado exaustivamente na elaboração de novas drogas que apresentam resultado terapêutico apenas na presença de determinados biomarcadores, o que sinaliza um papel cada vez mais relevante da análise genética no tratamento de doenças caracterizadas por alterações genéticas adquiridas somaticamente.

Genes acometidos por mutações germinativas associadas a cânceres hereditários	
Genes BRCA1 e BRCA2	Câncer hereditário de mama e ovário (SMOH)
Genes de reparo do DNA MSH2, MLH1, MSH6/ GTBP e PMS2	Síndrome de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) ou Síndrome de Lynch
Gene APC	Polipose Adenomatosa Familial (FAP)
Proto-oncogene RET	Neoplasia Endócrina de Tipo 2 (MEN2) no carcinoma medular da tireoide
Gene supressor de tumor MEN1	Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1
Gene CDKN2A	Melanoma Familiar
Gene E-cadherin CDH1	Câncer Gástrico Hereditário
Gene TP53	Síndrome de Li-Fraumeni

O uso do Imatinibe, inibidor da atividade da proteína tirosina cinase ABL, em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica, positivos para o gene BCR-ABL e do ATRA, em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda, positivos para o gene PML-RARA são os exemplos de maior sucesso do valor terapêutico de terapias alvo-específicas.

MARCADORES EPIGENÉTICOS E GLIOMAS

A epigenética trata das mudanças estáveis na expressão gênica que não envolvem alterações na sequência primária de nucleotídeos. A introdução de marcadores epigenéticos para a avaliação de resposta terapêutica é cada vez mais evidente, sendo os mais estudados a metilação do DNA, a modificação das histonas e os mecanismos que envolvem os micro-RNAs.

Nos gliomas, por exemplo, o status de metilação do promotor do gene MGMT modula a resposta das células aos agentes alquilantes. O silenciamento do gene MGMT por metilação causa a não expressão de uma enzima de reparo de DNA, o que faz com que, em última instância, pacientes com glioma e metilação de MGMT sejam aqueles que se beneficiam do uso de um agente alquilante de nova geração, a Temozolamida.

PERSPECTIVAS DA ANÁLISE GENÉTICA NO CÂNCER

É possível que nenhuma outra área do conhecimento tenha gerado tanta informação como os dados resultantes da análise dos mecanismos moleculares do câncer. Embora ainda existam ambiguidades em alguns resultados de sequenciamentos gênicos ("variantes de significado desconhecido"), a detecção de uma mutação familiar em um paciente pode levar à opção de realização de testes com alta sensibilidade e especificidade pelos familiares para determinação da presença da mesma mutação.

Atualmente, testes genéticos não estão disponíveis somente para doenças específicas, mas cobrem um universo de três bilhões de letras (A, C, T e G) relativo a 0,1 % do código genético de uma pessoa. Variações nessas sequências (por exemplo, a troca de um A por um T) determinam suscetibilidades genéticas diferenciadas. Consórcios com amostras de centenas a milhares de pacientes e indivíduos sadios, com base na hipótese de variantes comuns/doenças comuns, foram realizados em estudos de associação do tipo GWA para determinação da suscetibilidade individual a mais de 220 doenças, à procura de SNPs com frequências alélicas > 5%. Mais de 150 associações com níveis de significância elevados ($p < 5 \times 10^{-8}$) foram iden-

GWA (Genome wide scan)	Estudo de SNPs, distribuídos por todo o genoma, pelo método de micro-arrays, realizados a partir da comparação de padrões genômicos encontrados em indivíduos normais em comparação a indivíduos acometidos por uma determinada doença.
Polimorfismo	Alteração estável em uma sequência de DNA que é encontrada em uma frequência > 1% em uma determinada população.
SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	Polimorfismo de nucleotídeo único, que ocorre aproximadamente a cada 1Kb do genoma humano.
Arrays-CGH	Hibridização Genômica comparativa para avaliação de perdas e ganhos cromossômicos.
FISH	Técnica de citogenética molecular mais utilizada na patologia molecular. Utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência para detectar alterações genéticas do tipo translocação, amplificação ou deleção.
Micro-RNAs	Pequenos RNAs não codificantes de cadeia simples, de aproximadamente 20-22 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica.
Exoma	O genoma contém todo o DNA de um indivíduo. O exoma é a parte desse genoma que contém somente o DNA que codifica genes.

tificadas; entretanto, a implicação funcional dessas variantes ainda não é clara. Atualmente, as lacunas na construção de uma arquitetura genética do câncer devem ser preenchidas com o aperfeiçoamento das tecnologias de sequenciamento em massa obtidas pelos sequenciadores de 2ª e 3ª geração; pela definição de variantes raras por arrays de alta densidade e com a introdução da análise de exomas e do genoma total em consórcios para estudo de diferentes tipos de câncer. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

Dr. Gustavo Guida, Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dra. Shweta Dhar*

Genética molecular aplicada ao **câncer hereditário**

O câncer colorretal como um modelo para o entendimento das síndromes de câncer familial e de sua investigação

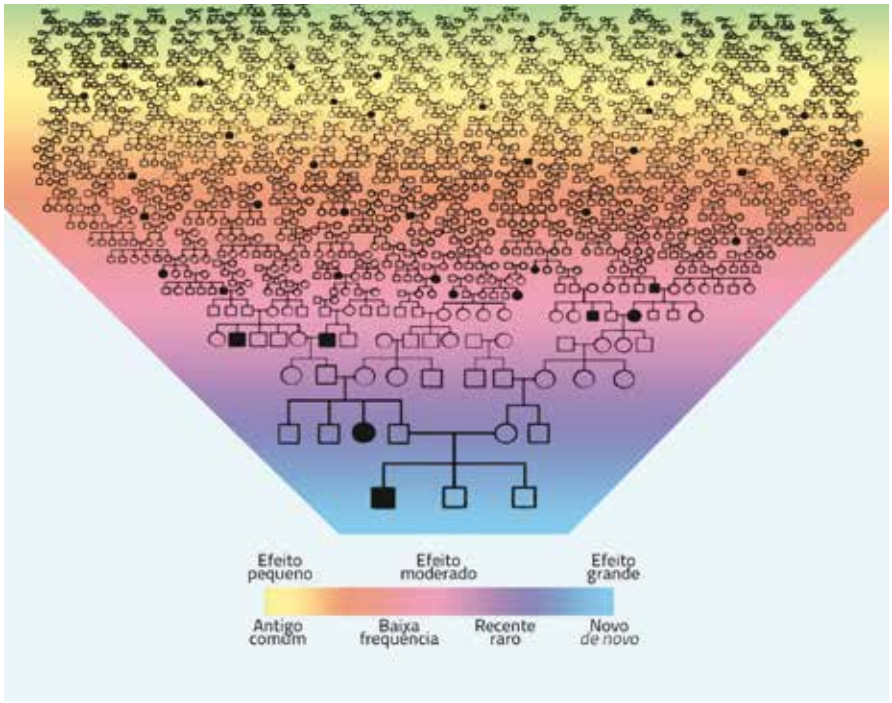
QUANDO USAMOS O TERMO "CÂNCER FAMILIAL", ENTENDEMOS RAPIDAMENTE QUE AQUILO QUE OCORRE NAS FAMÍLIAS PODE SER CHAMADO FAMILIAL. O padrão de apresentação de casos de câncer dentro de uma família, excluindo-se os casos de câncer esporádicos, pode ser o resultado da ação de múltiplos fatores ambientais e genéticos, com o acometimento de genes de baixa e média penetrância sem um padrão de herança mendeliana, ou da presença de uma mutação germinativa em um gene de alta penetrância. Este último, o câncer hereditário tem um padrão de herança mendeliana, na maior parte dos casos autossômico dominante.

Mas devemos manter uma questão em mente, sempre há uma primeira vez, mesmo no câncer chamado familial. Assim, pode haver casos em que a mutação está acontecendo pela primeira vez (casos *de novo*) em um indivíduo sem história familial, e uma vez tendo acontecido, estará presente em cada geração sucessiva. Por vezes, este fenômeno não é percebido ou diagnosticado, pois quando avaliamos um indivíduo com câncer colorretal (CCR), ou câncer de mama, e o histórico familiar é inexistente, não consideramos a hipótese daquele indivíduo ser o primeiro caso de mutação germinativa naquela família.

Da mesma forma, quando há história positiva na família, tendemos a pensar em síndromes familiais. Entretanto, há síndromes de câncer familiar em que múltiplos genes estão envolvidos e a investigação genética se torna complicada. Nesta situação, assim como nos casos *de novo*, os testes genéticos são úteis para o diagnóstico.

Na síndrome de Lynch, ou câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC), sabe-se que pelo menos 4 genes estão envolvidos, entretanto, o câncer de mama pode estar ligado a diversas síndromes de câncer familial, e, decidir que genes devem ser testados pode se tornar uma tarefa difícil. Há ainda as doenças ligadas a um único gene como a polipose adenomatosa familiar (FAP) ou a síndrome de Li-Fraumeni, onde temos basicamente o cenário de "um gene-uma doença".

Mutações *de novo*, ou seja, aquelas que acontecem pela primeira vez na linha germinativa e seguirão em cada geração de descendentes, são observadas em 30% dos casos de polipose adenomatosa familiar, e o primeiro caso da família pode realmente ser o paciente que se apresenta para sua avaliação. O mesmo ocorre com a neoplasia endócrina múltipla, retinoblastomas e cânceres oculares em crianças, onde o percentual de



A ancestralidade e sua relação com o tamanho de efeito fenotípico de uma mutação. Adaptado de Lupski JR et al, Cell, 2011.

casos hereditários decorrentes de mutações *de novo* pode chegar a 50%.

Assim, o desafio atual para os especialistas é reconhecer a possibilidade de estar diante de síndromes genéticas familiais, e a partir desta suspeita, escolher que testes genéticos poderão auxiliar no diagnóstico e aconselhamento familiar.

Se na historia familiar houver câncer em dois ou mais parentes próximos do mesmo lado da família, idade precoce ao diagnóstico, como por exemplo na 4ª década de vida, ou tumores bilaterais, considere um alerta para a possibilidade de predisposição hereditária ao câncer. Múltiplos tumores primários num mesmo indivíduo, como mama e ovário, ovário e útero, ou ovário e colo, são apresentações sindrômicas típicas que podem ser observadas num indivíduo, ou, talvez, em diferentes indivíduos da mesma família. Múltiplas gerações afetadas podem indicar transmissão autossômica dominante.

Um conceito importante no que tange as mutações relacionadas ao câncer familial hereditário é que elas são de linhagem germinativa, ou seja, estarão presentes em todas as células do indivíduo. Por isso podem ser testadas no sangue periférico, não precisam ser testadas em amostras tumorais. As mutações somáticas, ou seja, aquelas que acon-

> A complexidade da oncopatologia colorretal requer a aplicação de vários testes diagnósticos, seguindo fluxogramas específicos, de acordo com objetivo clínico. A diferenciação entre um CCR esporádico e familiar é significativa para a avaliação de riscos e estabelecimento prognóstico, assim como para definição da necessidade de avaliação genética e acompanhamento clínico de familiares

tecem no câncer esporádico, são um fenômeno adquirido no tumor propriamente, e portanto, fenômeno isolado, geralmente unilateral e de instalação mais tardia na vida. (Figura 1).

Neste contexto, a Figura 2A mostra o heredograma de um paciente masculino que nasceu com uma mutação germinativa de padrão de herança autossômica dominante. Ao longo da vida acontece um segundo evento (mutação somática) e este indivíduo desenvolve múltiplos tumores primários com apresentação bilateral. A Figura 2B apresenta um padrão associado aos cânceres esporádicos onde as mutações acontecem no próprio tumor (somáticas). Estas mutações estão associadas, a um aparecimento mais tardio da doença e a apresentação unilateral. Desta forma, a partir destas árvores genealógicas representativas da distribuição do câncer em duas famílias diferentes abordaremos o CCR.

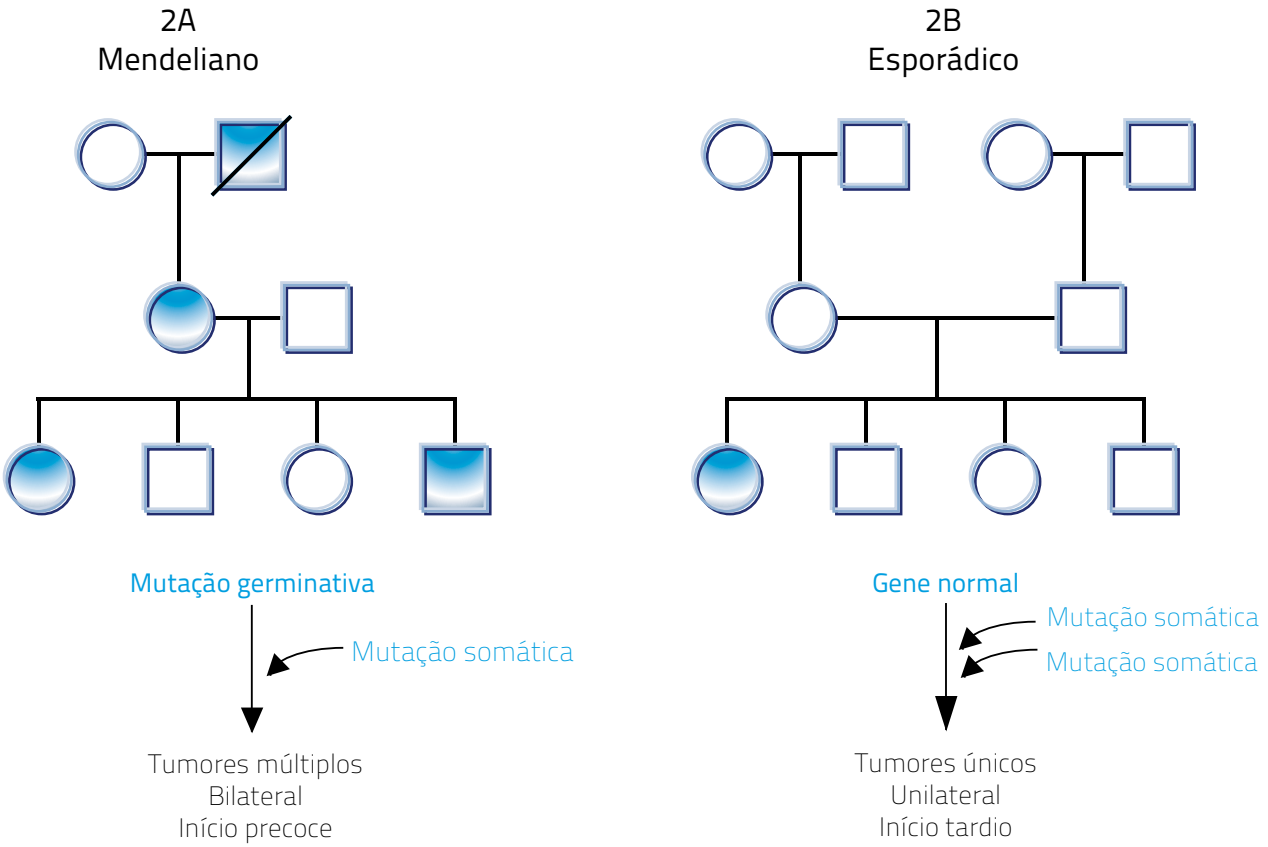
O CÂNCER COLORRETAL: UM MODELO PARA O CÂNCER HEREDITÁRIO FAMILIAL

Ao nível mundial, o CCR configura-se como o terceiro tipo de câncer mais comum. O risco populacional de desenvolvimento de CCR é de aproximadamente 6%, em contraste, o risco individual de um indivíduo com polipose adenomatosa familiar (FAP/APC) é quase 100%. Da mesma forma, o risco para os indivíduos portadores de mutações germinativas em genes de reparo associados a HNPCC é de 60-80%, e de 15-40% para aqueles com predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino, como as doenças inflamatórias intestinais.

A predisposição hereditária ao HNPCC pode ser definida com base nas características clínicas, segundo os critérios de Amsterdam, ou genéticas, de acordo aos critérios de Bethesda. Os CCR hereditários associados a polipose são doenças mais agressivas, e apresentam mutações nos genes APC, p53, K-ras, etc. Em contraste, o HNPCC ou Síndrome de Lynch, é menos agressiva e caracterizada por instabilidade de microssatélites e mutações nos genes de reparo do DNA (MMR). Além disso, a idade é um parâmetro primário para o diagnóstico diferencial das síndromes familiares no CCR. Se o indivíduo tem entre 30-35 anos, pensamos em FAP, se acima de 50 anos, pensamos em síndrome de Lynch. Isso pode ser ilustrado com um caso típico: Um homem caucasiano de 45 anos foi recentemente diagnosticado com carcinoma do cólon proximal. A colonoscopia revelou 6 pólipos. Sua mãe faleceu aos 50 de câncer ovariano, sua irmã mais velha foi diagnosticada com câncer de cólon aos 50 anos, e há mais 3 irmãos que ainda não realizaram colonoscopias. Não há historia de câncer no lado paterno da família, seu pai faleceu aos 75 por AVE. Desta forma, não parece que qualquer herança genética relacionada ao câncer possa ter vindo do lado de seu pai. Já o lado materno da família, é caracterizado por múltiplos membros com algum tipo de câncer (ovário e cólon). Tais características são sugestivas da síndrome de Lynch, ou câncer de cólon hereditário não-polipose (HNPCC). A denominação "não-polipose" pode levar a má interpretação, uma vez que é possível a ocorrência de pólipos no HNPCC, por isso a literatura recente sugere

Figura 1. Mutações podem ser Germinativas ou Somáticas

Figura 2. A) Heredograma representativo de um caso de CCR hereditário familiar; B) Heredograma representativo de um caso de CCR esporádico



que retornemos a denominação Síndrome de Lynch. Esta é a forma mais comum de CCR hereditário, sua transmissão tem padrão autossômico dominante, com uma probabilidade de 50% de transmissão à próxima geração. O câncer mais comum da Síndrome de Lynch é o CCR, mas podem ocorrer malignidades extra retais como o câncer uterino e ovariano.

Como discutido, a chance de desenvolvimento de CCR na presença de mutações associadas a síndrome de Lynch é de até 80%. É importante ressaltar que câncer colorretal esporádico também pode acontecer em famílias portadoras de Lynch, por exemplo, este indivíduo poderia ter um tio que faleceu de CCR aos 80 anos, devido a um CCR esporádico. Um heredograma de um paciente com CCR de início aos 40 anos poderia estar associado a presença de mulheres com câncer de endométrio aos 38 anos e ovariano aos 44, como segundo tumor primário. Este pedigree também é típico de Síndrome de Lynch, uma vez que estes dois tumores primários são incomuns em um mesmo indivíduo, principalmente quando associados à apresentação precoce.

O DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR NA SÍNDROME DE LYNCH

Os critérios de *Amsterdam propostos pelo International Collaborative Group on HNPCC* (ICG-HNPCC) para diagnóstico da Síndrome de Lynch são bastante restritivos: exigem o envolvimento de 3 membros da família; duas gerações sucessivas; um indivíduo com diagnóstico de câncer antes dos 50 anos e exclusão de FAP. Desta forma, um número significativo de famílias com síndrome de Lynch não é caracterizado quando aplicados os critérios de Amsterdam. Além disso, alterações genéticas herdadas que confirmem Lynch só são encontradas em 50% de pessoas com história familiar de acordo aos critérios de Amsterdam.

Desta forma, critérios mais robustos foram desenvolvidos. Estes consideram parâmetros de imunohistoquímica (IHC), histopatológicos e presença de instabilidade genética refletida pelo achado de instabilidade em regiões de microssatélites. Assim, o diagnóstico de suspeita de Síndrome de Lynch, assim como a indicação para a análise genética aumentou a partir dos achados da patologia.

Diversas estratégias têm sido publicadas na busca de custo-efetividade na investigação da síndrome de Lynch. Indicações baseadas em evidência são utilizadas na atualidade para subsidiar a decisão de pesquisa molecular para um paciente com suspeita de HNPCC. Entretanto, antes de abordarmos qual o algoritmo atual para o diagnóstico da síndrome de Lynch é importante entender os eventos genéticos-moleculares subjacentes a patogênese do CCR na síndrome de Lynch.

Eventos moleculares patogênicos alteram a via de reparo do DNA e resultam em instabilidade de microssatélites (MSI) que podem levar ao CCR na Síndrome de Lynch. O CCR com MSI tem tendência a adquirir mutações em genes importantes para o câncer, como resultado de defeitos no sistema de reparo do DNA (MMR). A deficiência no sistema MMR, quer devido à diminuição da expressão do gene ou mutação com perda de função, resulta na acumulação de alterações do DNA que podem manifestar-se como encurtamento anormal ou alongamento de sequências repetitivas de DNA (microssatélites), sendo este processo conhecido como instabilidade de microssatélites (MSI). Quatro genes, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, que codificam as proteínas MMR são responsáveis pelo aparecimento de CCR na Síndrome de Lynch.

No seu estado funcional, as proteínas MMR formam heterodímeros. MSH2 dimeriza com MSH6, e MLH1 dimeriza com PMS2. As proteínas MSH2 e MLH1 são parceiras dominantes e obrigatórias do seu dímero respectivo. Suas anormalidades podem resultar na degradação proteolítica do seu parceiro, com a consequente perda de ambas as proteínas. O inverso, no entanto, não é verdade. Quando a mutação ocorre em genes das proteínas secundárias, ou seja, MSH6 e PMS2, pode não haver perda concomitante das proteínas obrigatórias, MSH2 e MLH1, porque a função das proteínas secundárias pode ser compensada por outras proteínas. Como resultado, as mutações de MLH1 ou MSH2 frequentemente causam perda concomitante de MLH1/PMS2 ou MSH2/MSH6, respectivamente, enquanto que mutações de PSM2 ou MSH6 causam frequentemente perda isolada de PMS2 ou MSH6.

A demonstração da perda de proteínas MMR particulares é útil para direcionar quais os genes devem ser examinados por análise de mutações germinativas. Por exemplo, a perda da expressão de MSH2 e MSH6 geralmente indica a presença de uma mutação em MSH2. Perda de apenas MSH6 ou PMS2 indica geralmente a presença de uma mutação em MSH6 ou PMS2, respectivamente. As implicações são um pouco mais complexas para os tumores com perda de expressão de MLH1 e PMS2. Este padrão pode indicar a presença de uma mutação da linha germinativa, mas também pode ocorrer em aproximadamente 15% do CCR esporádicos devido à hipermetilação do promotor de MLH1.

Desta maneira, o padrão da imunohistoquímica (IHC) permite inferir a presença de mutação nos genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 com um painel de quatro anticorpos (anti- MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2), este pode ser utilizado para o diagnóstico de Sindrome de Lynch no lugar dos testes genéticos para análise de mutação. A vantagem econômica deste tipo de avaliação, para o *screening* do CCR na suspeita de Sindrome de Lynch, é obvia, já que o teste genético poderá ser realizado somente contra os genes que codificam as proteínas de expressão alterada.

Se o padrão encontrado na IHC é duvidoso ou normal o diagnóstico pode ser refinado pela realização de teste para MSI. Se a IHC e a MSI apresentam resultado normal,o diagnóstico de S. de Lynch é pouco provável.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CCR ESPORÁDICO E SÍNDROME DE LYNCH

A complexidade da oncopatologia colorretal requer a aplicação de vários testes diagnósticos, seguindo fluxogramas específicos, de acordo com objetivo clínico. A diferenciação entre um CCR esporádico e familiar é significativa para a avaliação de riscos e estabelecimento prognóstico, assim como para definição da necessidade de avaliação genética e acompanhamento clínico de familiares.

Tabela 1. Padrões IHQ para orientação de pesquisa de mutação em genes MMR

	IHQ MLH1	IHQ PMS2	IHQ MSH2	IHQ MSH6
Mutação MLH1	Perda	Perda	Preservada	Preservada
Mutação MSH2	Preservada	Preservada	Perda	Perda
Mutação MSH6	Preservada	Preservada	Preservada	Perda
Mutação PMS2	Preservada	Perda	Preservada	Preservada

A instabilidade de Microssatélites (MSI), definida como a expansão ou contração do número de repetições de marcadores polimórficos "short tandem repeat" ou STR, é observada em tumores associados a HNPCC, assim como em 10-15% de CCR esporádicos. A MSI pode ser determinada diretamente por PCR, ou indiretamente por imunohistoquímica (IHQ) para proteínas de reparo de DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2).

Para os casos de diagnóstico, geralmente é mais informativo executar os exames de MSI e IHQ ao mesmo tempo. Entretanto, em casos de um resultado de MSI-H (alto nível de MSI detectada por microssatélites), a IHQ pode ser adiada até que o paciente tenha sido notificado dos resultados, pois os resultados da IHQ para algumas das proteínas são altamente preditivos de uma mutação germinativa (por exemplo, hMSH2).

O perfil IHQ mais comum de um CCR esporádico com instabilidade é uma imunomarcação anormal para MLH1/PMS2. Entretanto, tumores associados a HPNCC podem também apresentar este perfil IHQ devido à presença de uma mutação germinativa no gene MLH1. O estudo da hipermetilação de MLH1 é considerado um método preciso e custo-eficaz de pré-triagem na seleção de pacientes candidatos para análise de mutação germinativa de MLH1 em casos suspeitos de CCR hereditário e expressão ausente da proteína MLH1. Neste tipo de abordagem, a pesquisa de mutação em genes de reparo deve ser empregada somente após a realização dos testes mencionados.

Tabela 2. Diagnóstico diferencial entre CCR esporádico e HNPCC/Síndrome de Lynch

Biomarcador	Frequência	
	CCR esporádico	S. de Lynch
Instabilidade de Microssatélites (MSI)	15%	>95%
Mutação BRAF V600E	50% do MSI esporádico	<1%
	5% de MSS	
	10% total	
Perda de expressão proteínas de reparo por IHQ	10–15%, principalmente MLH1	~90%
Hipermetilação promotor MLH1	~99% do MSI esporádico	<1%
	<1% MSS	
	15% overall	

A maioria dos CCR esporádicos com instabilidade de microssatélites apresentam também mutações no oncogene BRAF. Devido ao fato de que a mutação BRAF V600E e a metilação de MLH1 são comuns em CCR esporádicos com instabilidade de microssatélites, e muito raras em S. Lynch, estas duas características podem ser usadas para diagnóstico diferencial entre estas duas entidades.

O algoritmo de diagnóstico do CCR esporádico vs. HNPCC/Síndrome de Lynch é cada vez mais complexo e inclui: o estudo de expressão de genes MMR; a identificação do genótipo MSI; a detecção da mutação V600E de BRAF e a hipermetilação do promotor de MLH1 que direcionam a escolha de um alvo molecular para estudos genéticos mais complexos de mutações e deleções germinativas em genes MMR específicos. Finalmente, estas mutações, uma vez detectadas em um caso índice, podem ser usadas como ferramenta para a identificação de portadores e familiares em risco.

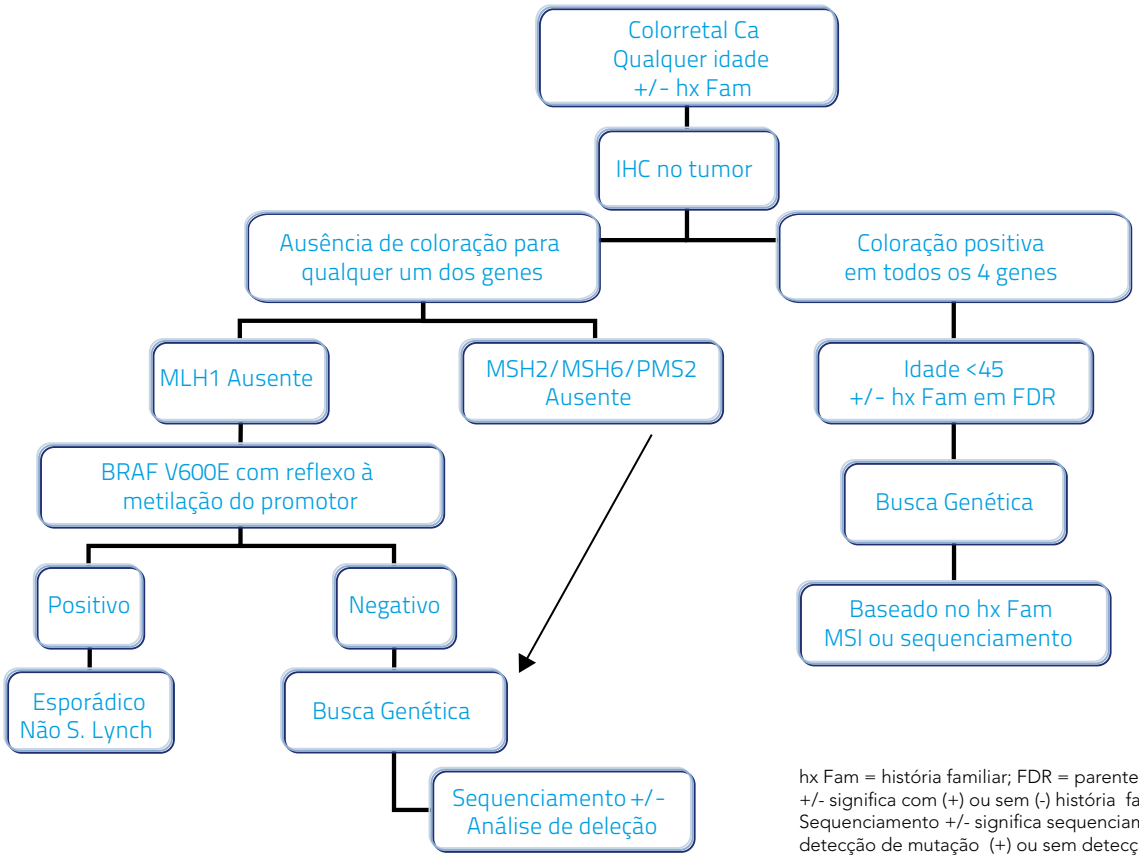
PREDIÇÃO DE RESPOSTA TERAPÊUTICA E PROGNÓSTICO CLÍNICO

No CCR, a detecção de mutações somáticas específicas pode ser preditiva da resposta a terapias alvo-específicas, em particular para a escolha de pacientes que podem se beneficiar das terapias com inibidores da via EGFR dentre aqueles negativos para as mutações de KRAS e BRAF V600E (Tabela 3 e 4). É de se notar, que a presença de MSI, têm também um papel importante como marcador de prognóstico, ressaltando o impacto clínico das diferenças genéticas entre os subtipos da doença.

Tabela 3. Terapia alvo-específico para mutações de KRAS

Teste Genético	Aplicabilidade	Alvo Terapêutico
Mutação KRAS	Mutações nos códons 12 (70-80%), 13 (20-30%), e 61 (raras) 40% dos pacientes com CCR, Kras+, não elegíveis para terapia alvo EGFR Se KRAS negativo, status de BRAF (V600E) deve ser investigado	Resistência à terapia anti-EGFR. Escolha de candidatos para terapia alvo-específica com cetuximab, panitumumab. (NCCN, ASCO)

Figura 3. Algoritmo para a abordagem do CCR



hx Fam = história familiar; FDR = parentes de 1 geração; +/- significa com (+) ou sem (-) história familiar; Sequenciamento +/- significa sequenciamento com detecção de mutação (+) ou sem detecção de mutação (-).

Tabela 4. Biomarcadores para predição de resposta terapêutica ou prognóstico clínico

Alvo	Tipo	Método	Status de Validação	Aplicação terapêutica
EGFR	Prognóstico e preditivo	Mutação KRAS	Forte	cetuximab, panitumumab
BRAF	Preditivo	Mut. V600E	Moderado	Sensibilidade inibidores de BRAF/MEK
PIK3CA	Preditivo	Mut. PIK3CA / perda PTEN	Baixo	Sensibilidade inibidores PIK3CA, mTOR ou AKT
MSI	Prognóstico, Preditivo	Instabilidade em painel de microssatélites	Moderado	Sensibilidade pré-clinica a 5-FU, sensibilidade a irinotecan e mitomicina C

Uma descrição mais detalhada da aplicação dos testes genéticos para seleção de terapias alvo-específica e prognóstico, incluindo a dosagem de fármacos usados na quimioterapia é apresentada na Tabela 5.

CONCLUSÕES

Os testes genético-moleculares em um indivíduo com suspeita de CCR hereditário e familiar têm implicações importantes tanto para o indivíduo afetado, como para os potenciais familiares em situação de risco. Para abranger a complexidade da oncopatogênese colorretal, as abordagens diagnósticas incluem muitas e complexas metodologias e alvos biológicos.

A identificação de uma mutação germinativa permite que o teste possa ser estendido para familiares, ampliando o círculo de prevenção e detecção precoce, tão importante para a possibilidade de cura desta doença, a um custo relativamente pequeno e com precisão de essencialmente 100%.

Tabela 5. Testes genéticos aplicados a predição de resposta terapêutica e toxicidade

Mutação BRAF V600E	10% dos pacientes CCR Kras-negativo	Resistência à terapia anti-EGFR. Escolha de candidatos para terapia alvo-específica com cetuximab, panitumumab. Provável associação com prognóstico. (NACB)
MSI – Instabilidade de microssatélites	Definido como >30% de loci instáveis no painel de consenso do NCI, ou >40% loci instáveis num painel de microssatélites com repetições mononucleotídicas	Melhor resposta à terapia anti-EGFR. Melhor prognóstico. (NCCN, NACB)
Mutações PIK3CA	Sugerido para CCR metastático	Podem indicar falha na resposta à terapia anti-EGFR. Aumento significativo na mortalidade associada à CCR. Podem identificar tumores com resposta a drogas com alvo em genes downstream PIK3CA na via de AKT/mTOR.
Polimorfismos DPYD, TYMS e MTHFR - 8 polimorfismos	Detecta variantes genéticas que influenciam o metabolismo e ação da 5-FU, para identificar pacientes em risco de toxicidade	Sensibilidade ao 5-Fluorouracil
Genotipagem UGT1A1 (UDP glucuronosiltransferase 1A1)	Detecta a variante genética alelo UGT1A1*28, para identificar pacientes em risco de toxicidade.	Sensibilidade ao irinotecan (FDA)

Em contraste, a identificação de uma lesão molecular é importante para a escolha terapêutica, a vigilância do tratamento e o prognóstico da doença.

Mesmo em países com maiores recursos, a relação custo-benefício em investimentos para estratégias apropriadas de prevenção e detecção precoce do câncer do cólon e reto tem impossibilitado a implantação de rastreamento populacional. Desta maneira, é responsabilidade da comunidade médico-cientifica o estabelecimento dos melhores algoritmos para lograr um diagnóstico precoce com a maior precisão possível para indivíduos em risco genético ou ambiental. Estratégias cuidadosas devem ser empregadas para minimizar os ensaios desnecessários e, ao mesmo tempo, maximizar a contribuição dos resultados dos testes para o diagnóstico final. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

***Dr. Gustavo Guida**
Membro Titular SBGM;
Consultor para Genética Médica Grupo DASA;
Médico Geneticista CEGEMERJ.

***Dra. Shweta Dhar**
Diretora médica de Genética de Adultos da *Baylor College of Medicine*;
Chefe da Seção de Genética do *Michael E. Debakey VA Medical Center.*

Dra. Ilana Zalcberg Renault*

Genética do **câncer de mama**

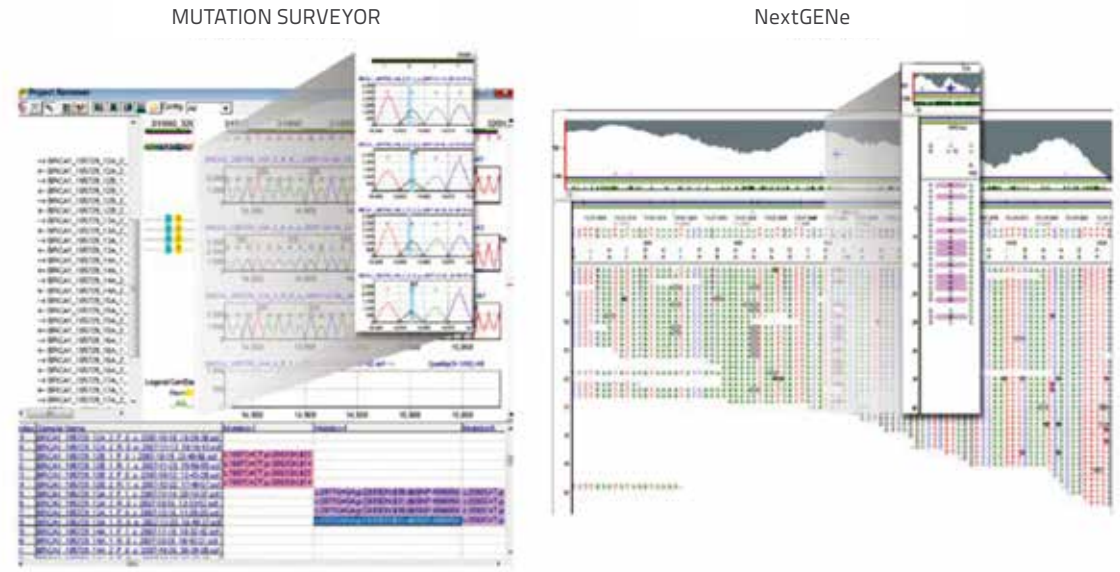
A complexa paisagem genética do câncer de mama familiar – para além de BRCA1 e BRCA2

DE ACORDO COM AS ESTATÍSTICAS DO INCA (ESTIMATIVA 2012, INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL), temos no país aproximadamente 53.000 novos casos/ano de câncer de mama feminino. O câncer de mama é o mais frequente nas mulheres. A estimativa mundial em 2008 era de 1,38 milhões de novos casos diagnosticados.

Pacientes com história de câncer de mama em membros da família estreitamente relacionados são considerados portadores de câncer de mama familiar (CMF) e representam 5-7% de todos os casos de câncer de mama. Dentro deste grupo, apenas 25% dos casos podem ser atribuídos a presença de mutações germinativas em dois genes de alta suscetibilidade para o CMF: BRCA1 e BRCA2. A presença destas mutações confere um risco cumulativo, até os 70 anos, de 65% para BRCA1 no câncer de mama e 39% no de ovário, enquanto para o BRCA2 é de 39% e 11%, respectivamente.

DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CMF

Mutações em outros genes associadas a algumas síndromes familiares, em que a incidência de câncer de mama se encontra aumentada, têm uma frequência estimada de 5% para o CMF. Estas mutações acometem os genes TP53 (Síndrome de Li Fraumeni), PTEN (Síndrome de Cowden), STK11 (Síndrome de Peutz-Jeghers) e CDH1 (Câncer Gástrico Hereditário). Mutações nos genes, de penetrância incompleta, BRIP1, PALB2, RAD51C e XRCC2, da via de sinalização da AF (Anemia de Fanconi), também foram reportadas. Além destas, mutações em outros genes, ATM, CHEK2, NBS1, RAD50, RAD51D e RAD51B, que também conferem uma suscetibilidade moderada, e não pertencentes à via da AF, são observadas. Estes dois tipos são encontrados em aproximadamente 5% dos casos de CMF. Finalmente, a identificação recente de 41 genes de baixa suscetibilidade, além de outros 26 genes previamente



Painéis de análise molecular das regiões codificantes de BRCA 1 e 2, em duas diferentes tecnologias (Mutation Surveyor® e NextGENe®).

identificados, perfaz um total de 67 genes associados a um risco aumentado de desenvolvimento do câncer de mama em 14% dos CMF.

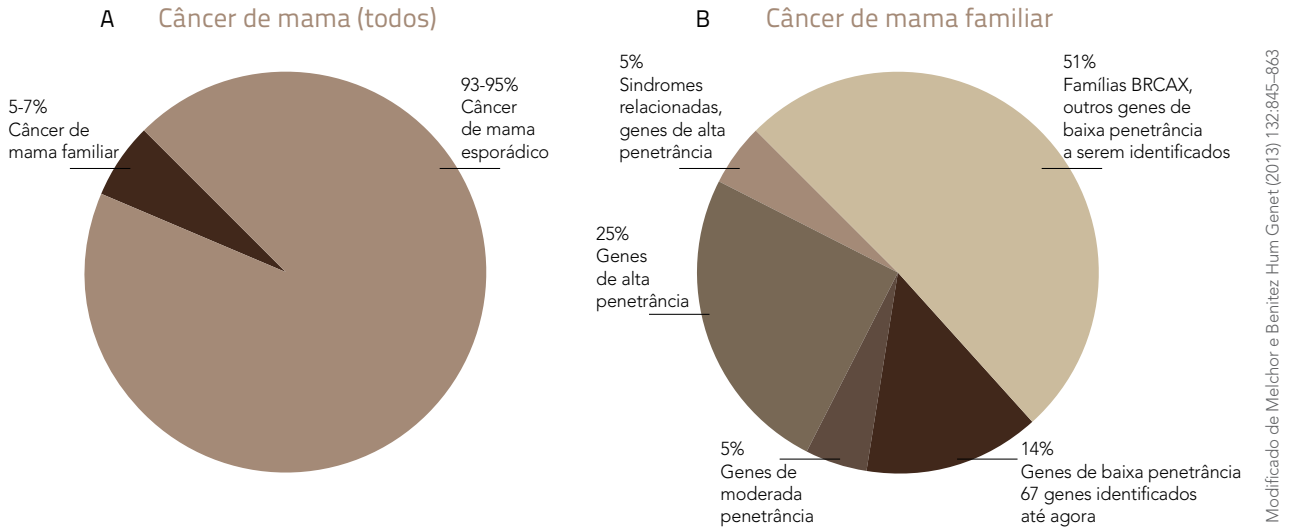
CMF – NÃO BRCA 1 E 2

Aproximadamente 50% dos pacientes com CMF não são portadores das mutações conhecidas e anteriormente descritas e são classificados na categoria CMF não-BRCA1/2 ou como famílias *BRCAX*. O CMF nestas famílias decorre da alteração de múltiplos genes, de penetrância baixa ou moderada. Nestes casos, a suscetibilidade aumentada ao câncer de mama poderia ser atribuída a um modelo de doença poligênico, resultante da ação conjunta de vários *loci* gênicos de baixa penetrância. A Figura 1 mostra a substituição do câncer de mama esporádico e familiar (Figura 1a) e a distribuição de mutações em genes de alta, média e baixa penetrância associadas ao CMF (Figura 1b).

As proteínas codificadas pelos genes BRCA1 e BRCA2 influenciam a integridade genômica. A fim de direcionar a recomendação de testes genéticos para famílias de alto risco para o CMF e também para a estratificação de pacientes, objetivando a individualização terapêutica, se faz necessário o uso de diferentes técnicas e estratégias de análise.

> O entendimento dos mecanismos moleculares de reparo e manutenção da integridade de DNA, pela ação de BRCA1 e 2, auxiliou na identificação de outros genes, que quando alterados atribuem uma suscetibilidade aumentada ao CMF. A identificação de mutações nestes genes (CHEK2, ATM, BRIP1, PALB2, RAD51C), de menor penetrância, auxilia na determinação do risco familiar para o câncer de mama e pode ser utilizada para terapias alvo específicas

Figura 1. Distribuição dos pacientes com câncer de mama: (a) câncer de mama familiar representa uma pequena fração de todos os pacientes acometidos pela doença. (b) proporção de pacientes com câncer de mama familiar (CMF) devido a mutações germinativas em genes de alta, moderada e baixa penetrância. CMF positivo para mutações nos genes de alta penetrância BRCA1 e 2 são encontradas em uma grande proporção de CMF, entretanto o CMF em famílias negativas para estas mutações (famílias BRCAX) pode ser atribuído a um modelo poligênico pela ação de diversos genes de penetrância baixa ou moderada



DETERMINAÇÃO DE RISCO: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES

O entendimento dos mecanismos moleculares de reparo e manutenção da integridade de DNA, pela ação de BRCA1 e 2, auxiliou na identificação de outros genes, que quando alterados atribuem uma suscetibilidade aumentada ao CMF. A identificação de mutações nestes genes (CHEK2, ATM, BRIP1, PALB2, RAD51C), de menor penetrância, auxilia na determinação do risco familiar para o câncer de mama e pode ser utilizada para terapias alvo específicas.

A análise destes genes, em estudos do tipo caso-controle, revelou uma associação entre a presença de mutações e o aumento do risco, que pode ser de 2 a 3 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de mama.

Mutações nestes genes apresentam uma frequência e penetrância bem menor, quando comparadas a mutações em BRCA1 e BRCA2. Desta forma, a hereditariedade conferida pela presença de mutações nestes genes se dá pelo efeito cumulativo de vários alelos, que individualmente apresentam uma penetrância baixa ou moderada, mas quando associados aumentam o risco relativo segundo um modelo poligênico.

GENES DE PENETRÂNCIA MODERADA

- ATM: uma correlação entre o câncer de mama e a ataxia-telangiectasia (ATM) foi proposta a partir do reconhecimento que mães de crianças com ATM apresentavam maior frequência de câncer de mama. O gene ATM atua no reparo da dupla fita do DNA, e nele foram identificadas diversas mutações deletérias. Diferentes tipos de mutação conferem riscos diferenciados à predisposição ao câncer de mama. Mutações do tipo *misssense* conferem um risco maior do que mutações que geram uma parada da leitura (*stop* códon) e do que as que acometem regiões reguladoras da edição de RNA (*splice site mutations*);
- CHEK2: inicialmente descrito como um gene de alta penetrância para a Síndrome de Li-Fraumeni, este gene hoje é reconhecido como fortemente associado como de penetrância moderada para o desenvolvimento do câncer de mama. O gene CHECK 2 codifica uma quinase, que regula proteínas de controle (BRCA1, P53 e Cdc25c), reguladoras do reparo do DNA frente a um dano. A mutação 1100delC apresenta frequência elevada em populações do norte da Europa. Mesmo em mulheres onde a associação entre a mutação em CHECK 2 e Li-Fraumeni está ausente, o ris-

Contextualizando a Genômica: Síndromes Familiares

- Câncer de mama triplo-negativo (receptores estrógeno-RE$^-$ e progesterona-RP$^-$ e HER2 negativo) e idade ≤ 60 anos: considerar teste para BRCA1/2;
- Câncer triplo-positivo (receptores estrógeno-RE$^+$ e progesterona-RP$^+$ e HER2 positivo) e idade ≤ 35: considerar teste de P53 e Síndrome de Li-Fraumeni;
- Câncer de mama do tipo lobular, com história familiar para câncer gástrico: considerar teste de *CDH1* para a síndrome do câncer gástrico difuso hereditário;
- Câncer de mama associado a lesões mucocutâneas, macrocefalia, câncer de endométrio ou câncer de tireóide papilífero ou folicular: considerar teste de PTEN para a síndrome de Cowden;
- Instabilidade de microssatélites e história familiar de câncer colorretal ou endometrial: considerar testes de genes de reparo para a síndrome de Lynch.

co para o desenvolvimento do câncer de mama está duplicado. Mutações em CHECK2 são mutuamente exclusivas em relação às mutações em BRCA1 e 2, a ausência de coocorrência pode ser entendida pelo conceito de não redundância, CHECK2 e BRCA-1 e 2 estão envolvidos nas mesmas vias celulares de sinalização;

- Complexo MRN (MRE11, RAD50 e NBS1): o complexo MRN participa da manutenção da integridade do genoma frente a um dano no DNA, sendo o sensor principal na detecção do dano, pela sinalização para ATM, direcionando-a aos locais de quebra da dupla fita. Portadores de mutação nestes genes apresentam maior probabilidade de desenvolver câncer de mama. Uma mutação fundadora, 687delT no gene RAD5, carrega um risco aumentado de 4,3 vezes para a predisposição ao câncer de mama na população finlandesa. De maneira similar, a mutação 657del5 no gene NBS1 carrega um risco aumentado de 3,1 vezes para a predisposição ao câncer de mama na população de ascendência bielorrussa. Mutações germinativas no gene MRE11 são raras;
- Genes da via da Anemia de Fanconi (BRIP1, PALB2, RAD51C, SLX4): um defeito em qualquer das proteínas ao longo da via de sinalização da anemia de Fanconi (AF) impede que as células efetuem um reparo de DNA efetivo, predispondo a quebras cromossômicas e morte celular. A relação entre a AF e a suscetibilidade ao câncer de mama se tornou aparente quando se descobriu que BRCA2 é de fato uma proteína da via da AF (FANCD1). Mutações monoalélicas em outros genes que codificam proteínas da via da AF, BRIP1 e PALB2 também foram associadas a um risco relativo aumentado de 2 vezes, em relação à população controle, para a predisposição ao câncer de mama. O gene PALB2 é chamado de parceiro e "colocalizador" de BRCA2. Mutações germinativas em PALB2 são raras, sendo, portanto, difícil de determinar sua penetrância. Entretanto, a mutação do tipo c.3113G>A é frequente na população australiana e apresenta alta penetrância nesta população, sendo associada a um risco de 90% de desenvolvimento de câncer de mama até os 70 anos. Desta maneira, a penetrância de diferentes tipos de mutações germinativas em PALB2 ainda é uma questão a ser investigada. De maneira similar a BRCA2, mutações em PALB2 são associadas a um risco aumentado para a predisposição de câncer de próstata e de pâncreas. Mutações deletérias em RAD51C foram encontradas em famílias com alta incidência de câncer de mama e ovário. É de se notar a maior associação destas mutações ao câncer de ovário em comparação ao câncer de mama. Mulheres portadoras destas mutações podem desenvolver câncer de ovário sem o desenvolvimento de câncer de mama. Este fato é contrastante às mutações em BRIP1 e PALB2, que são associadas somente ao câncer de mama. O efeito deletério de mutações em outros genes desta via, como por exemplo, o SLX4, está em investigação.

Dicionário de termos genéticos

- **Penetrância:** a proporção de indivíduos portadores de uma variação de um gene que a expressa no seu fenótipo.
- **Mutações missense:** quando a substituição de uma base modifica a sequência de três bases relativas a um códon, alterando um aminoácido em relação à sequência referência.
- **Mutações nonsense:** que são mais deletérias, porque podem ocasionar o término imediato da proteína pela introdução de um códon de parada imediata (*stop códon*), ao invés de adicionar um aminoácido.
- Mutações que modificam a fase de leitura (*frameshift*) da sequência de nucleotídeos após a mutação, ocasionando a partir daí a formação de uma sequência de aminoácidos completamente diferente – ou interrompendo prematuramente a formação da proteína com a introdução de um *stop códon*.

Associando a Patologia Molecular ao Estudo de Mutações no CMF

FENÓTIPOS PREVALENTES ASSOCIADOS A BRCA1 E BRCA2

Características clínicas, como início precoce da doença e história familiar positiva, por apresentarem alta associação com mutações no gene BRCA1, tornam-se relevantes para a recomendação de realização de testes genéticos a uma paciente.

A inclusão de características morfológicas e imuno-histoquímicas (IHC), do câncer de mama ou ovário, em algoritmos preditivos na avaliação da probabilidade de ocorrência de mutações em BRCA1, melhorou a precisão do processo de seleção para o encaminhamento de pacientes para avaliação genética.

Estas características incluem: carcinoma ductal invasivo, alto grau do ponto de vista histológico, tripla negatividade para os receptores (estrógeno-RE^- e progesterona-RP^- e HER2 negativo), além de elevada expressão de marcadores de células basais (CK5/6, CK14, CK17, EGFR). Desta forma, tem-se que a grande maioria dos CMF com alteração em BRCA1 resultante da presença de mutações, inserções, deleções ou metilação do promotor pode ser classificada como cânceres de mama do tipo triplo negativo com fenótipo "basal- simile" (TNBL).

Esta classificação pode ser tangenciada pela procura de marcadores de células por IHC, que auxilia na discriminação dos carcinomas basal-símile dentre o heterogêneo grupo de tumores triplos negativos.

Entretanto, vale notar que uma paciente jovem com câncer de mama e fenótipo TNBL é provavelmente portadora de uma mutação germinativa no gene BRCA1. Entretanto, a falta deste fenótipo não exclui a presença de mutação em BRCA1, uma vez que cânceres RE positivos ou sem o fenótipo basal são observados em 15-29% dos casos com mutação em BRCA1.

As características morfológicas e imuno-histoquímicas (IHC) do câncer de mama positivo para mutações germinativas no gene BRCA2 são mais heterogêneas. Entretanto, existe uma tendência para o seguinte fenótipo: grau histológico baixo ou intermediário, positividade para RE e negatividade para HER2.

Se levada em conta a classificação baseada no perfil de expressão gênica, os cânceres BRCA2 positivos se enquadram no grupo "Luminal" (assinatura genética semelhante à célula luminal do ducto mamário), em particular no grupo Luminal B.

Os cânceres de mama positivos para a mutação em BRCA2 são associados à expressão aumentada de CHECK e localização núcleo citoplasma alterada de RAD51C (localização nuclear diminuída). Este fenótipo permite diferenciar os BRCA2 positivos dos BRACAX (CMF sem mutação em BRCA) com uma probabilidade estimada de aproximadamente 76%. Vale ressaltar que mutações germinativas no gene TP53 são recorrentes nos cânceres BRCA1 e BRCA2 positivos.

Importância da Detecção de Mutações Germinativas Associadas ao CMF no Tratamento

INDIVIDUALIZAÇÃO TERAPÊUTICA PARA OS PORTADORES DE MUTAÇÕES EM BRCA1 E 2

Pacientes com mutações germinativas em BRCA apresentam defeito na reparação homóloga (RH) do DNA. Este fato pode ser explorado a partir da individualização terapêutica contra células defeituosas em RH.

O uso de drogas a base de platina (cisplatina), como terapia neoadjuvante, antes da cirurgia, se mostrou promissor no tratamento de pacientes portadoras de mutações em BRCA1 e/ou BRCA2. Entretanto, os efeitos adversos da cisplatina são uma desvantagem para a sua utilização.

Recentemente, uma nova classe de droga, inibidores da *poly* (ADP-ribose) *polimerase* (PARP), tem sido utilizada. Inibidores de PARP impedem o reparo das fitas simples de DNA, levando as células a tentar corrigir as quebras através de um mecanismo alternativo de recombinação homóloga. Células tumorais, positivas para BRCA, são deficientes para a recombinação homóloga e, portanto, sofrem apoptose, criando desta forma uma janela para a intervenção terapêutica.

Estudos de fase I-II com a droga Olaparib (inibidor de PARP), em portadores de mutações em BRCA, demonstraram tolerância e benefício terapêutico. De maneira similar, estudos clínicos com os inibidores de PARP se mostraram efetivos em mulheres com câncer de ovário portadoras de mutação no gene PALB2. Estudos sobre o uso combinado de inibidores de PARP e cisplatina estão em andamento.

UTILIZAÇÃO DO INIBIDOR DE PARP PARA CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO, NEGATIVO PARA MUTAÇÕES EM BRCA1 E 2 E COM PERDA DA FUNÇÃO DE BRCA

Como discutido, a maioria dos CMF positivos para BRCA1 tem fenótipo "basal-simile" (TNBL), entretanto, este fenótipo também pode ser encontrado no câncer de mama esporádico. Nestes, a perda de função de BRCA1 pode ocorrer, não pela presença de mutações germinativas, mas por silenciamento epigenético (metilação do promotor), levando à repressão da transcrição gênica.

O fenótipo TNBL representa 15% dos cânceres de mama invasivos e são associados a prognóstico adverso apresentando poucas possibilidades terapêuticas. Nestes casos, na ausência de mutações em BRCA1 e 2, mas com a expressão de BRCA1 diminuída, em consequência do silenciamento gênico pela metilação do promotor, é recomendada a individualização terapêutica com o uso de inibidores de PARP.

CONCLUSÃO

Os tempos atuais refletem uma enorme expansão do conhecimento genético na oncologia. A premissa é que o avanço do conhecimento das bases genéticas do câncer seja traduzido para a prática médica.

A abordagem clínica tradicional se baseia na estimativa do risco para a predisposição do câncer, já a análise genética visa preencher a lacuna da contribuição das mutações germinativas (herdadas), das mutações somáticas (adquiridas), em um indivíduo em particular, no momento do diagnóstico, a fim de adequar e individualizar a terapia.

O desenvolvimento técnico-científico atual, com o uso de sequenciadores de próxima geração (NGS), permite uma abordagem genética capaz de evidenciar quais vias de sinalização celular se encontram alteradas, para cada indivíduo acometido por um determinado tipo de câncer. A inclusão deste conhecimento na prática clínica permitirá tanto a gestão do risco como a individualização terapêutica, contribuindo, portanto, para a perspectiva de uma medicina personalizada. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

Dra. Michele Migliavacca*

A evolução da **citogenética molecular**

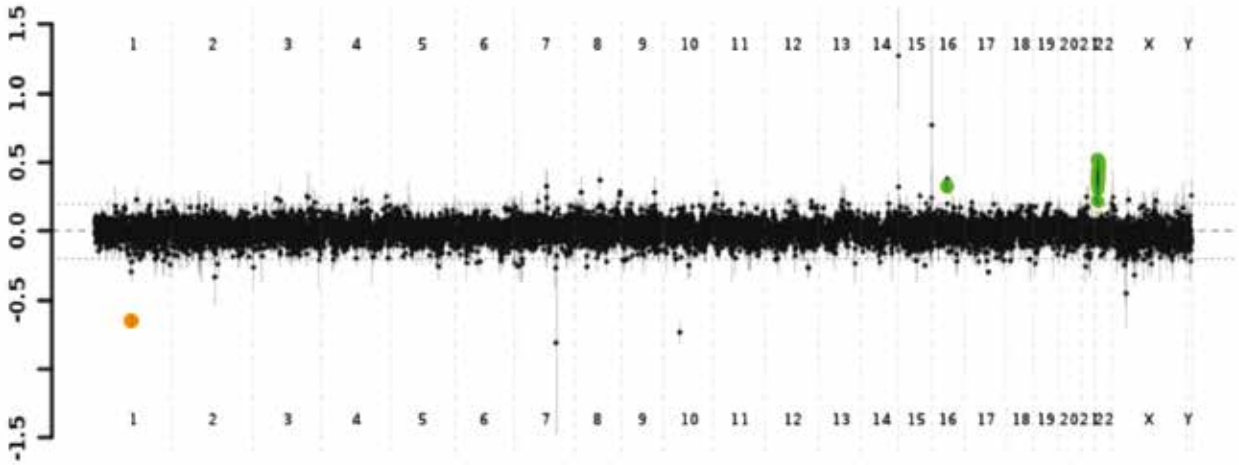
Aplicações na Genética Clínica das mais modernas tecnologias moleculares

DA CITOGENÉTICA À CITOGENÔMICA

A DESCOBERTA QUE A CÉLULA HUMANA APRESENTA 46 CROMOSSOMOS SE DEU EM 1956, a partir do trabalho de Tijo e Levan em metáfases obtidas de cultura de células embrionárias pulmonares. A partir de então, diversos estudos relacionando defeitos cromossômicos a síndromes já conhecidas, como a Síndrome de Down e Klinefelter, tiveram início. Os cromossomos eram classificados pelo tamanho e morfologia dada pela posição do centrômero. Em 1971, a introdução do bandamento G permitiu a identificação dos cromossomos com maior precisão. A coloração utilizada resulta em um padrão de bandas transversais claras e escuras, sendo que as regiões escuras são ricas em bases AT e possuem poucos genes ativos, enquanto as regiões claras têm DNA rico em bases GC com muitos genes ativos. O melhor momento para se realizar a análise das bandas é durante a metáfase, pois os cromossomos estão na fase máxima de condensação, podendo chegar a uma resolução de 400 a 550 bandas. Se lembrarmos que o genoma humano contém aproximadamente 3 bilhões de pares de bases, e que no cariótipo com banda G conseguimos "enxergar" em média 400-550 bandas ou partes do genoma, podemos então dividir a quantidade total de bases por 400-550 e assim teremos regiões de 7.500.000-6.000.000 pares de bases, ou 7,5 a 6 Mb. Portanto, alterações menores que este tamanho não serão visualizadas no exame de cariótipo. Desta forma, o questionamento subsequente seria: qual a real dimensão de doenças genéticas causadas por alterações cromossômicas não visíveis ao cariótipo, que ainda não haviam sido descobertas? O que estaríamos perdendo ou deixando de diagnosticar por uma limitação técnica?

Em 1976, Yunis introduziu a técnica de bandamento de alta resolução em cromossômicos prometáfasicos com maior número de bandas, permitindo uma resolução de até 5Mb. Porém, foi na década de 1980 que a citogenética foi beneficiada com a incorporação da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH – *Fluorescent in situ hybridization*). Nesta técnica, o DNA cromossômico é hibridizado com sondas específicas para cada região cromossômica marcadas com um fluorocromo visualizável sob microscopia. Com o uso desta técnica, foi possível realizar o diagnóstico de diver-

Figura 1. Representação gráfica de análise cromossômica por CMA



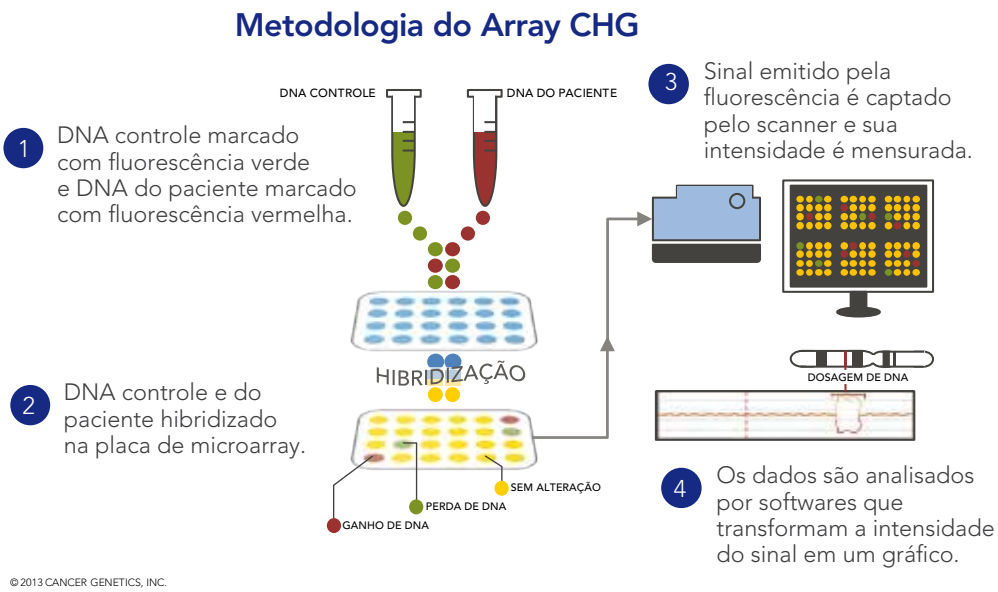
sas alterações antes não visualizadas no cariótipo com banda G, tal como as microdeleções 15q12 na Síndrome de Prader-Willi, deleção 22q11.2 na Síndrome DiGeorge, deleção 7q na Síndrome de Willians, entre outras.

Diversas doenças genômicas novas foram caracterizadas – estas foram definidas por alterações do genoma menores de 5Mb e maiores que 10Kb. Uma evolução ocorrida a partir da técnica de FISH foi a Hibridação Genômica Comparativa (CGH – *Comparative Genomic Hybridization*), que permite a detecção de ganhos e perdas de segmentos ainda menores do cromossomo. Essa técnica é baseada na co-hibridação de um DNA teste e um DNA referência marcados com fluorocromos diferentes em lâminas contendo cromossomos metáfasicos normais. A incorporação dos arranjos ou arrays permitiu que a hibridização, ao invés de ocorrer em um cromossomo metáfasico normal, acontecesse em uma plataforma com sequências genômicas conhecidas, construídas a partir de BACs ou oligonucleotídeos. Esta técnica ficou conhecida como array CGH.

Atualmente, existem técnicas de arrays baseadas na hibridação unicamente do DNA teste na

> Uma densidade maior de sondas permite uma melhor avaliação de CNVs baseados nas sondas adjacentes, aumentando a acurácia da interpretação dos dados. Os SNPs arrays também trazem informações de CNVs e sua demanda tem aumentado principalmente no diagnóstico de Distúrbios do Desenvolvimento com ou sem mal formações associadas

Figura 2. Array CGH



plataforma contendo oligonucleotídeos tanto de regiões com variação do número de cópias (CNVs – *Copy Number Variation*) quanto com sequências de polimorfismos (SNPs – *Single Nucleotide Polimorphism*). Os SNP arrays possuem a vantagem de detectar perda de heterozigosidade, dissomia uniparental e ainda possibilita a identificação da origem parental da alteração genômica. Entretanto, vale ressaltar que estas técnicas, tanto CGH quanto SNP array, não identificam alterações cromossômicas equilibradas e não fornecem informação referente à posição do material em desequilíbrio.

A IMPORTÂNCIA DO ENTENDIMENTO DAS PLATAFORMAS DE ESTUDOS GENÔMICOS

A análise de microarrays é capaz de caracterizar diversas alterações cromossômicas, melhorando a possibilidade de se chegar a um diagnóstico final conclusivo. No entanto, médicos que solicitam este exame devem estar atentos às diferentes plataformas disponíveis e à resolução de cada uma, como, por exemplo: BAC, oligonucleotídeos, customizado, genoma completo e SNP. Um oligoarray do genoma completo pode detectar CNVs que não são identificadas em um array de BAC customizado, ou ainda, um array de SNP pode detectar longas regiões de homozogosidade associadas com dissomia uniparental ou consanguinidade, ambas condições que aumentam o risco para doenças autossômicas recessivas.

A resolução do array depende da quantidade e do tipo de sondas utilizadas e de como elas estão distribuídas pelo genoma. Sondas de BAC são maiores, sendo que seu comprimento pode variar de 75.000-150.000 pb, enquanto que as sondas de oligonucleotídeos são menores e podem variar de comprimento entre 50 a 60 pares de bases. Isso se traduz em uma menor especificidade na detecção de pontos de quebras para as sondas de BAC. Uma densidade maior de sondas permite uma melhor avaliação de CNVs baseados nas sondas adjacentes, aumentando a acurácia da interpretação dos dados. Os SNPs arrays também trazem informações de CNVs e sua demanda tem aumentado principalmente no diagnóstico de Distúrbios do Desenvolvimento com ou sem mal formações associadas.

O aumento da utilização de um teste diagnóstico traz uma melhor compreensão da gama dos possíveis – e às vezes inesperados – resultados. Isto fica claro nos casos de array CGH e na identificação dos chamados CNVs benignos. Um consórcio internacional de mais de 75 laboratórios foi formado para responder a esta pergunta: *The International Standard Cytogenomic Array Consortium*, que está investigando a possibilidade de se estabelecer um modelo universal para reportar e arquivar os resultado de CGH arrays, tanto os patológicos como os benignos, e desta forma trazer uma informação o mais atualizada possível.

UTILIDADE CLÍNICA

Mesmo com a melhora da tecnologia de CMA (*Chromosomal Microarray Analysis*), ainda existem limitações deste teste, como, por exemplo, a não identificação de translocações balanceadas, ou a distinção de uma trissomia livre de uma translocação Robertsoniana. Algumas aneuploidias podem não ser identificadas como XYY se o sexo controle errado for usado. A identificação de mosaicismo de baixo grau ainda é difícil. Um microarray também não deve ser solicitado como exame de primeira linha quando um resultado rápido é necessário, como, por exemplo, na avaliação de um recém-nascido, especialmente se uma trissomia é suspeitada. Neste caso, é indicado realizar um cariótipo com banda G. Algumas plataformas de CGH levam 48 horas apenas para hibridização. Tendo estas limitações em mente, seguem algumas recomendações nas quais a realização de um CMA (*Chromosomal Microarray Analysis*) é de grande valia para o diagnóstico do paciente.

RECOMENDAÇÕES

1. CMA com análise de CNVs no período pós-natal para avaliação de:
   a. Anomalias múltiplas que não se encaixam no diagnóstico de uma síndrome malformativa conhecida;
   b. Atraso no Desenvolvimento e/ou Deficiência intelectual aparentemente não sindrômica;
   c. Distúrbios do Espectro Autista.
2. Follow-up é recomendado quando um desbalanço cromossômico é identificado por CMA incluindo estudos com FISH, realização de CMA nos pais e aconselhamento genético.

Fora do escopo do consultório médico, os SNPs arrays têm sido utilizados em estudos de GWAS (*Genome Wide Association Studies*) para elucidar as bases genéticas de doenças comuns e multifatoriais, como Hipertensão e Diabetes, com intuito de analisar as vias de sinalização envolvidas nestas patologias, bem como identificar possíveis alvos terapêuticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas descritas neste artigo trazem informações do genoma humano em diferentes níveis de resolução e potenciais de aplicação. Atualmente, o ponto crítico destas técnicas ainda é discriminar as alterações benignas das patológicas. A implementação de diretrizes e bancos de dados nacionais é de extrema importância para melhoria da interpretação destes dados. A quantidade de alterações cromossômicas e rearranjos no genoma humano é praticamente ilimitada – portanto, há um grande potencial para que novas doenças genômicas sejam desvendadas com uso destas técnicas. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Michele Migliavacca**
Geneticista Clínica;
Doutoranda do Departamento de Genética e Morfologia da UNIFESP;
Consultora em Genética Médica da DASA.

Dra. Ilana Zalcberg Renault, Dra. Lucia Monteiro de Castro Lima
e Dra. Elizabeth Xisto Souto*

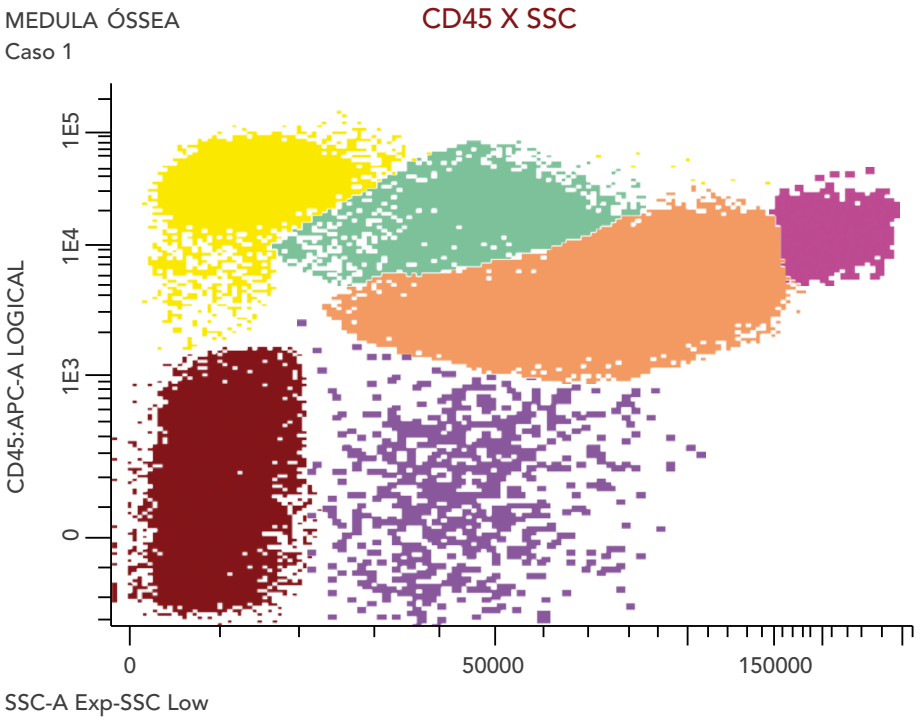
Abordagem laboratorial integral na onco-hematologia – **neoplasias mieloides**: Parte 1

A importância da biologia molecular no diagnóstico, prognóstico e manejo de pacientes com neoplasias mieloides

AS CINCO CATEGORIAS DE NEOPLASIAS MIELOIDES relacionadas na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)-2008 são: (i) a leucemia mieloide aguda (LMA), um grupo heterogêneo caracterizado pelo bloqueio da diferenciação e proliferação clonal de uma célula mieloide imatura, forma mais comum de leucemia em adultos e responsável por 20% das leucemias na infância; (ii) a síndrome mielodisplásica (SMD), com seus diferentes subtipos: citopenias refratárias, com comprometimento de uma ou mais linhagens, a anemia refratária (AR), a anemia refratária com excesso de blastos (AREB), além da SMD não classificável; (iii) as neoplasias mieloproliferativas (NMP), que englobam a leucemia mieloide crônica (LMC), a leucemia neutrofílica crônica (LNC), além das NMP clássicas, BCR-ABL negativas, que são a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária; (iv) a categoria mielodisplásica/mieloproliferativa (SMD/NMP), termo que engloba a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), e LMMC – Juvenil, LMC atípica, leucemia eosinofílica crônica, síndrome hipereosinofílica, mastocitose, além das SMD/ NMP não classificáveis; (V) a categoria das neoplasias associadas a eosinofilia e anormalidades nos genes PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1 (Síndrome Mieloproliferativa 8p11) (Figura 1). Uma outra entidade, ainda não incorporada à classificação da SMD em 2008, anemia refratária com sideroblasto em anel associada à trombocitemia, foi descrita recentemente.

Tecnologias de diagnóstico molecular recentes de alta performance permitiram estudos de larga escala que revelaram um conjunto de novas mutações somáticas recorrentes no grupo de neoplasias mieloides. Interessantemente, as diferentes neoplasias mieloides compartilham as mesmas classes de mutação, fazendo com que, molecularmente, sejam bastante homogêneas (Figura 2). Estudos recentes demonstram o valor dessas mutações como biomarcadores para as neoplasias mieloides.

Pretendemos, nesta primeira abordagem, apresentar uma visão atual do diagnóstico multidisciplinar na LMA e SMD, com ênfase no uso de biomarcadores genéticos para o diagnóstico, prognóstico e individualização terapêutica.



Citometria multiparamétrica (CFM) para análise de leucemias.

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

A abordagem laboratorial da LMA é multidisciplinar e engloba a caracterização morfológica, imunofenotípica, citogenética e molecular dos blastos leucêmicos. A classificação morfológica é baseada no fenótipo morfo-citoquímico associado à linhagem (indiferenciado, mieloide, monoblástico, eritroblástico ou megacarioblástico). Na classificação FAB, oito subtipos distintos são discriminados (MO a M7). A imunofenotipagem e o uso da citometria de fluxo multiparamétrica têm papel fundamental na identificação dos diferentes subtipos, discriminam a LMA da LLA, além de identificarem as leucemias agudas de linhagem mista mieloide e linfoide e os subtipos indiferenciados. De acordo com a classificação recomendada pela OMS para neoplasias mieloides, os marcadores (anti)MPO, CD11b, CD14, CD64, CD3, CD19, iCD22, iCD79a e CD10 são essenciais para especificação de linhagens e definições de leucemias agudas de fenótipo misto.

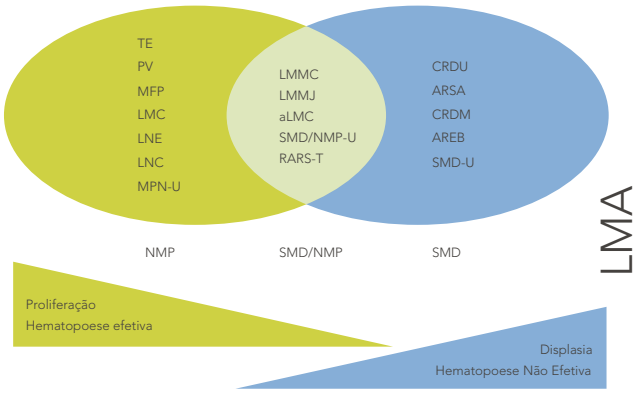
A LMA é uma doença extremamente heterogênea em seu comportamento clínico e prognóstico. Apesar da intensidade da terapia, mais da metade das crianças, e entre 40 e 90% dos adultos com LMA, recaem. A LMA é classificada em grupos de prognóstico favorável, desfavorável e intermediário de acordo com a presença ou não de alterações citogenéticas ao diagnóstico, e havendo alteração, do tipo específico desta. Mesmo dentro dos subgrupos de LMA considerados favoráveis pela presença de alterações específicas, como no caso da leucemia promielocítica aguda (LPA ou LMA-M3), alguns pacientes não respondem à terapia ou têm recaídas tardias. Além disso, uma grande maioria dos pacientes com LMA (45% no adulto e 25% nas crianças) tem cariótipo normal (CN) ao diagnóstico e é tida como de risco intermediário, sendo este o grupo que apresenta a maior heterogeneidade quanto à evolução clínica.

Uma vez que o prognóstico desta doença é muito desfavorável, a detecção e discriminação de biomarcadores para classificação e prognóstico são críticos para a condução do tratamento, intervenção em tempo e indicação de transplante alogênico de células-tronco. A detecção de alterações cromossômicas pelo diagnóstico citogenético é utilizada para

determinação de grupos de risco ao diagnóstico para a adequação do tratamento a ser desenvolvido. Desde 2001, a presença dessas alterações é considerada o principal fator prognóstico da LMA. Em 2008, uma atualização realizada pela OMS incorporou as alterações moleculares na classificação das LMAs. A principal modificação ocorreu no grupo mais heterogêneo (LMA-CN), de acordo a evolução clínica, que foi discriminado de acordo com o status mutacional dos genes FLT3, NPM1 e CEBPA (Tabela 1).

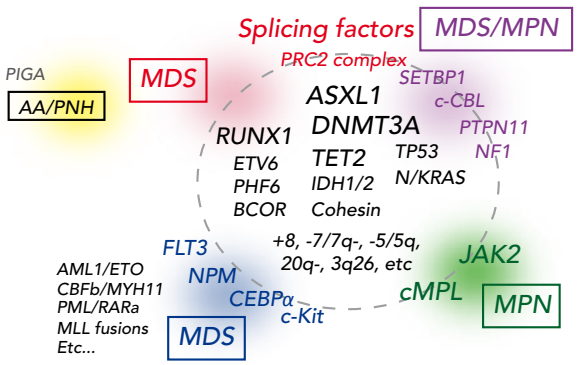
Desde então, estes marcadores moleculares têm sido utilizados na rotina diagnóstica e no acompanhamento das LMAs permitindo a individualização terapêutica. No subgrupo da LMA-M3, positivos para o gene de fusão *PML-RARA*, os pacientes são beneficiados pelo tratamento alvo-específico com ácido transretinoico (ATRA). Entretanto, pacientes com LMA-M3 portadores do gene de fusão mais raro *PLZF- RARA*, equivalente molecular t(11;17) apresentam resistência primária à indução com o ATRA. Da mesma forma, pacientes com alteração no fator de transcrição CBF

Figura 1. As 5 categorias de neoplasias mieloides da classificação da WHO 2008 estão representadas com hematopoese defeituosa



Subjacentes a todas as categorias e subtipos, tem-se a proliferação e a diferenciação mais ou menos alteradas; em uma ponta temos as NMP com maior proliferação e hematopoese efetiva e, na outra, a SMD com predomínio de displasias hematopoese defeituosa.

Figura 2. Co-ocorrência de alterações moleculares nas neoplasias mieloides



Co-ocorrência de mutações gênicas sugerem mecanismos leucemogênicos comuns às neoplasias mieloides; a questão da abordagem laboratorial atual é estabelecer um catálogo de mutações doença-específico que seja utilizado para diagnóstico e individualização terapêutica. SF: splicing factors – fatores envolvidos na edição de RNA; MLL fusion: fusões com o gene MLL; Cohesin: categoria gênica do tipo coesina.

> Quase metade dos pacientes com SMD apresentam Cariótipo Normal (CN). A capacidade de reconhecer os pacientes com IPSS-R de baixo risco com um prognóstico pior do que o esperado pode ter implicações importantes para a seleção de terapias risco-adaptadas. No último ano, uma série de estudos importantes foi publicada descrevendo a análise da incidência e impacto clínico de mutações na SMD. Foi determinado que pacientes com mutações nos genes ASXL1, RUNX1, TP53, ETV6 e EZH2 apresentam sobrevida global significativamente menor quando comparados àqueles sem mutação, tendo a presença da mutação apresentado valor prognóstico independente de qualquer outra variável

e portadores das anormalidades citogenéticas t(8;21) e inv(16) ou de seus equivalentes moleculares RUNX1--RUNXiT1 e CBFB-MYH11, pertencentes ao grupo de prognóstico favorável, quando também apresentam mutação em *cKit* (15-40%) ou mutação do tipo duplicação (DIT) em *FLT3* (5-10%) apresentam maior risco de recidiva. Desta forma, um algoritmo para a avaliação do paciente com LMA ao diagnóstico é hoje proposto com base nos marcadores moleculares (Figura 3).

Tabela 1. Classificação prognóstica da LMA- OMS 2008

Grupo genético	
Favorável	t(8;21); AML1-ETO); RUNX1-RUNXiT1
	inv(16) ou t(16;16); CBFB-MYH11
	NPM1 mutado sem FLT3 - DIT cariótipo normal)
Intermediário-I	NPM1 mutado com FLT3-DIT (cariótipo normal)
	NPM1 selvagem e FLT3-DIT (cariótipo normal)
	NPM1 selvagem sem FLT3-DIT (cariótipo normal)
Intermediário II	T(9;11); MLLT3-MLL
Alterações citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas	
Adverso	LMA com t(6;9); DEK-NUP214
	LMA com inv(3) ou t(3;3)
	T(v;11) (v;q23); rearranjo MLL
	-5 ou del(5q); -7; anormalidade (17p); cariótipo complexo (>3 alterações)

DIAGNÓSTICO E MANEJO CLÍNICO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD)

SMD é uma doença heterogênea, e isso se reflete nos diferentes subtipos da classificação FAB que varia desde citopenias de uma ou mais linhagens, anemia refratária com excesso de blastos até o subtipo caracterizado pela deleção isolada da região 5q-. A OMS determina que a abordagem laboratorial mínima da SMD deve conter: (I) avaliação hematológica do esfregaço do SP, mielograma e biópsia da MO e; (II) análise citogenética. A metodologia padrão para avaliação citogenética da SMD é a coloração cromossômica por bandeamento G ainda que o FISH possa ser recomendado para os casos com ausência de metáfases. A avaliação por citometria de fluxo e rastreamento de mutações podem ser recomendados ou sugeridos para o auxílio diagnóstico.

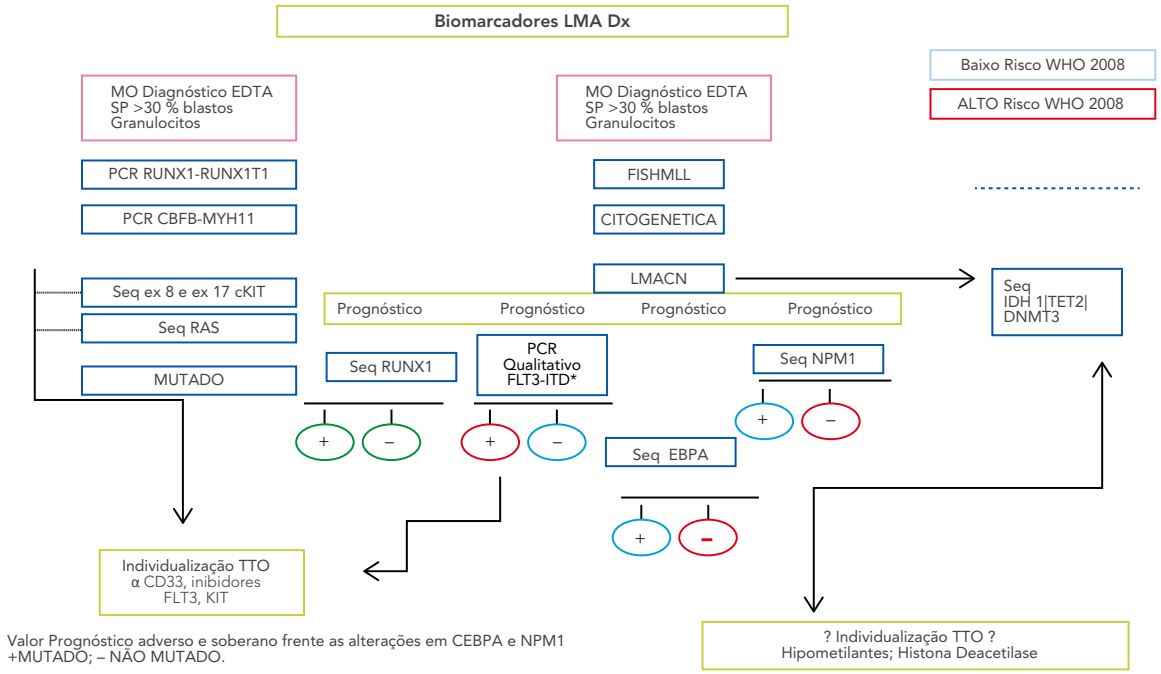
O prognóstico dos pacientes é muito heterogêneo, daí a necessidade de aplicar sistemas prognósticos que permitam estratificação de risco e auxiliem na decisão terapêutica adaptada ao risco, sendo o sistema internacional de pontuação prognóstica – IPSS – o mais utilizado.

Um outro sistema de classificação, IPSS-R, foi proposto. As principais mudanças do IPSS-R em relação ao IPPS foram: (I) os grupos de risco citogenético passaram de três para cinco; (II) as alterações citogenéticas menos frequentes foram incluídas nos

Tabela 2. Critérios clínicos e grupos de risco categorizados, sistemas de avaliação prognóstica das alterações citogenéticas da OMS-2008

Sistemas de pontuação prognóstica			
	IPSS	WPSS	IPSS-R
Variáveis clínicas	(1) % blastos	(1) Classificação da OMS	(1) % blastos n MO
	(2) Cariótipo	(2) Cariótipo; e	(2) Cariótipo
	(3) numero de citopenias	(3) Intensidade transfusional	(3) Níveis de hemoglobina
			(4) Contagem de plaquetas
			(4) Contagem de neutrófilos
Subgrupos citogenéticos	(1) Bom;	(1) Bom;	(1) Muito bom;
	(2) Intermediário; e	(2) Intermediário; e	(2) Bom
	(3) Ruim	(3) Ruim	(3) Intermediário
			(4)Ruim
			(5) Muito Ruim
Classificação prognóstica das alterações citogenéticas	(1) Muito Bom;	-Y, del(11q)	
	(2) Bom	normal, del(5q), del(12p), del(20q), dupla incluindo del(5q)	
	(3) Intermediário	del(7q), +8, +19, i(17q), qualquer outra em clones independentes ou duplas	
	(4) Ruim	-7, der(3q), dupla incluindo -7/del(7q), complexa com 3 alterações	
	(5) Muito Ruim	complexa > 3 alterações	

Figura 3. Algoritmo Diagnóstico para o paciente com LMA



Algoritmo Diagnóstico para o paciente com LMA. À esquerda, pacientes com alteração no fator de transcrição do tipo CBP. Na parte intermediária, a abordagem do paciente com LMA-CN. À direita, a estratificação baseada na ausência ou presença de mutação nos genes CEBPA, NPM-1 e FLT3 incorporadas à classificação da WHO de 2008.

grupos de risco citogenético, como por exemplo, del(11q), del(12p), +19, e i(17q); e (III) a estratificação de prognóstico clínico passou de quatro categorias de risco para cinco (muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto) (Tabela 2).

Este sistema mostra uma maior capacidade de discriminação em relação à sobrevida e progressão para LMA. No momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresenta doença de baixo risco. Entretanto, apesar da previsão de um curso clínico relativamente benigno, um subgrupo destes pacientes tem doença mais agressiva e sobrevida global mais curta. Os pacientes de alto risco são normalmente tratados com agentes hipometilantes (5-azacitidina e decitabina) ou, quando elegíveis, é indicado o transplante alogênico de células-tronco. Aos pacientes de baixo risco são geralmente oferecidas terapias menos agressivas, incluindo fatores de crescimento, suporte transfusional ou simplesmente a observação ativa sem tratamento. Um grupo destes últimos pacientes pode se beneficiar também de tratamentos com agentes hipometilantes ou a droga imunomoduladora lenalidomida.

Entretanto, quase a metade dos pacientes com SMD apresenta Cariótipo Normal (CN). A capacidade de reconhecer os pacientes com IPSS-R de baixo risco com um prognóstico pior do que o esperado pode ter implicações importantes para a seleção de terapias risco-adaptadas.

No último ano, uma série de estudos importantes foi publicada descrevendo a análise da incidência e impacto clínico de mutações na SMD. Foi determinado que pacientes com mutações nos genes ASXL1, RUNX1, TP53, ETV6 e EZH2 apresentam sobrevida global significativamente menor quando comparados àqueles sem mutação, tendo a presença da mutação apresentado valor prognóstico independente de qualquer outra variável.

Um modelo prognóstico foi proposto levando-se em conta parâmetros IPPS e status mutacional: mutações em EZH2 e ASXL1 são mais associadas aos grupos de risco baixo e intermediário1. A proposta é que pacientes de baixo risco e portadores de mutação em ASXL1 e EZH2 sejam tratados com esquemas mais agressivos do que o predito pelo IPSS. Em contraste, mutação em TP53 é vista mais no grupo de risco intermediário II ou alto e associada ao ca-

riótipo complexo, trombocitopenia severa e número de blastos aumentado. A presença da mutação apresenta valor prognóstico independente.

Estes resultados sugerem que a inclusão do status mutacional de TP53, EZH2, ETV6, RUNX1 e ASXL1 irá adicionar mais informação útil aos sistemas prognósticos atuais.

Outro aspecto de interesse é o de se identificar alterações genéticas que permitam a individualização terapêutica. Por exemplo, a presença da del5q, detectada por FISH, é preditiva da resposta a lenalidomida. Da mesma maneira, mutações no gene EZH2 parecem indicar, quando presentes, uma melhor resposta ao agente demetilante 5-Aza.

Finalmente, é de se considerar que os futuros sistemas de classificação e pontuação para determinação prognóstica possam incorporar as mutações somáticas nos modelos existentes. Alternativamente, os novos esquemas de classificação e sistemas de pontuação de prognóstico poderão ser desenvolvidos, fundamentalmente, com base nas alterações moleculares. Neste caso, o uso de metodologias para análise genômica, como o sequenciamento de próxima geração (SNG), será incorporado na abordagem diagnóstica das SMD. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

***Dra. Lucia Monteiro de Castro Lima**
Hematologista;
Médica do setor de citometria de fluxo;
Coordenadora do grupo de medula óssea DASA-RJ.

***Dra. Elizabeth Xisto Souto**
Médica Hematologista da DASA;
Residência médica de Hematologia e Hemoterapia pela UNESP;
Mestre em Hematologia pela UNIFESP.

Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto*

Câncer de pulmão: Paradigmas terapêuticos da doença

O uso dos marcadores moleculares no prognóstico e no tratamento do câncer de pulmão

RESUMO

O câncer de pulmão é a neoplasia mais incidente nos Estados Unidos, quando excluído o câncer de pele não melanoma. Doença agressiva de progressão implacável e até recentemente com poucas opções de tratamento.

No contexto dos tumores sólidos, o tratamento do Câncer de Pulmão Não Pequenas Células (CPNPC) foi pioneiro no uso das terapias-alvo específicas. Mutações no gene EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) são preditivas da terapia com inibidores da atividade tirosina Kinase (ITK) em pacientes com CPNPC. Em contraste, mutações em K-RAS/BRAF são associadas à resistência a terapias-alvo dirigidas. Com o entendimento atual da heterogeneidade da doença e da existência de uma evolução clonal, na qual o clone do diagnóstico pode estar sub-representado na recidiva, a existência de um genoma acionável possibilita o uso de terapias-alvo, ao longo do tratamento, dirigidas contra diferentes mutações diretoras. A classificação atual do câncer de pulmão associa marcadores histológicos e moleculares com valor terapêutico. Entretanto, a resistência à terapia-alvo ainda é um problema clínico relevante. Em particular, a mutação T790M é responsável por, pelo menos, 60% dos casos de resistência ao uso de inibidores de tirosina quinase (ITK) anti-EGFR.

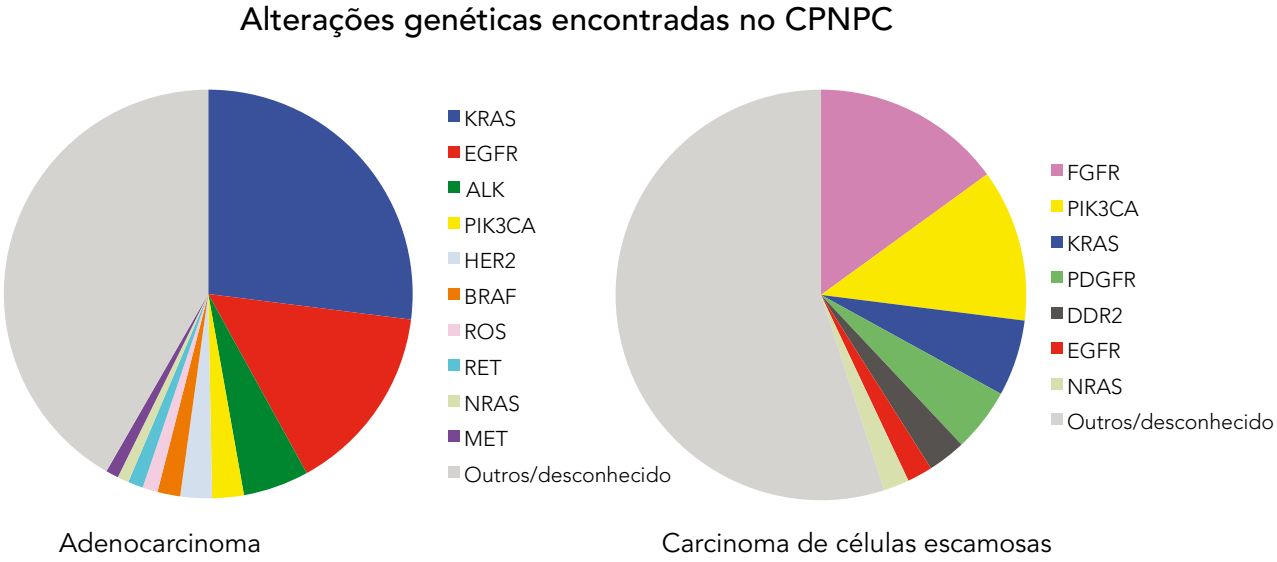
CLASSIFICAÇÃO

Histológica

Histologicamente, o câncer de pulmão é classificado como Carcinoma de Pulmão de Pequenas Células (CPPC) e o heterogêneo grupo de Câncer de Pulmão Não Pequenas Células (CPNPC).

O termo CPNPC é usado para qualquer tumor epitelial do pulmão que não apresente componente de pequenas células, representa cerca de 80% dos casos dos tumores de pulmão e engloba vários subtipos – dentre eles o adenocarcinoma (em torno de 50% dos casos) e o escamoso (em torno de 25%). Essa classificação tem sido refinada pela inclusão dos novos dados moleculares e de terapias específicas para cada subtipo.

Figura 1. Fonte: Ann Oncol 2011;22:2616-24



Genética

Alterações genéticas clinicamente relevantes variam dentre os diferentes tipos histológicos. As alterações genéticas de maior incidência nos adenocarcinomas são em ordem decrescente: mutação em KRAS e em EGFR, rearranjo em ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), amplificação de MET, mutação em PIK3CA, mutação em HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*), mutação em BRAF (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1*) e rearranjo de ROS1 (*ROS proto oncogene 1*). No total, cerca de 40% dos casos apresentam alterações não recorrentes ou desconhecidas. Nos CPPC do tipo escamoso são: amplificação em FGFR1, mutação em PTEN, amplificação de PDGFRA, mutação em PIK3CA, amplificação de MET e mutação em DDR2. Um maior número de casos (em torno de 60%) apresenta alterações ainda não conhecidas.

TERAPIAS, ALVOS E BIOMARCADORES

Mutações em EGFR e uso dos ITK de EGFR

A via de sinalização do EGFR é complexa. A ativação do receptor pela associação ao ligante ou por mutações que atribuem ganho de função leva à fosforilação de resíduos de tirosina, dando início à transdução de sinais intracelulares que ativam as vias de sinalização MAPK (RAS/RAF/MEK) e a fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K/AKT/mTOR) e de outros transdutores de sinais e fatores de transcrição. A ativação dessas vias contribui para o crescimento celular, a proliferação, a diferenciação, a mobilidade e a sobrevida celular. A via da MAPK e PI3K pode ser também ativada por meio da ativação dos receptores HER2, MET, FGFR1 e ROS1. Alterações do tipo amplificação, superexpressão, translocação e mutação nesses receptores, assim como em moléculas sinalizadoras das vias (KRAS), resultam no aumento da sobrevivência celular, proliferação e diminuição da apoptose.

As mutações em EGFR são alvo terapêutico para o uso dos ITK de EGFR. As mutações encontradas nos CPNPC ocorrem nos éxons 18, 19, 20 e 21 e afetam o sítio de ligação ao ATP. As alterações mais comuns, que conferem sensibilidade ao uso dos inibidores da atividade tirosina Kinase-ITK, Gerfitinibe e Erlotinibe, são a mutação pontual L858R no éxon 21 e as deleções no éxon 19, encontradas em aproximadamente 90% dos pacientes com CPNPC. Mutações no éxon 18 (G719) e inserções ou substituições no éxon 20 (T766) perfazem 5% dos casos. Estudos clínicos em CPNPC metastático demonstram maior sobrevida livre de progressão (SLP) em pacientes com EGFR mutado em uso de ITK do que em uso de quimioterapia convencional. O genoma acionável (mutações passíveis de serem

Tabela 2. Alvos genéticos com drogas aprovadas ou em estudo clínico para uso em CPNPC

Gene	Alteração Genética	Frequência Adenocarcinoma	Frequência Ca. Células escamosas
AKT1	Mutação	1%	0%
ALK	Rearranjo/ mut	3-7%	0-3%
BRAF	Mutação	1-3%	3%
DDR2	Mutação	0%	~4%
EGFR	Mutação	10-35%	4%
FGFR1	Ampliação	<2%	20-25%
HER2	Mutação	2-4%	2%
KRAS	Mutação	15-25%	6%
MEK1	Mutação	1%	0%
MET	Ampliação	2-4%	0%
NRAS	Mutação	1%	1%
PIK3CA	Mutação	1-3%	3%
PTEN	Mutação	4-8%	18%
RET	Rearranjo	1%	0%
ROS1	Rearranjo	1%	0%

Genoma acionável do CPNPC: **verde:** alvos genéticos com drogas aprovadas para tratamento para o uso em CPNPC (EGFR e ALK); **laranja:** alvos alternativos ao ALK para uso do ITK Crizotinibe; **azul:** alvos de drogas já aprovadas para uso em outros cânceres; **branco:** drogas em desenvolvimento clínico. Crizotinibe é um inibidor de tirosina quinase dual ALK/MET aprovado pela FDA para NSCLC ALK+. Atividade anti-ROS1 *off-target* é observada com o uso de Crizotinibe.

> Alterações genéticas clinicamente relevantes variam dentre os diferentes tipos histológicos. As alterações genéticas de maior incidência nos adenocarcinomas são em ordem decrescente: mutação em KRAS e em EGFR, rearranjo em ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), amplificação de MET, mutação em PIK3CA, mutação em HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*), mutação em BRAF (*v-Rafmurine sarcoma viral oncogene homologue B1*) e rearranjo de ROS1 (*ROS proto oncogene 1*)

utilizadas como alvo terapêutico) do câncer de pulmão classificado em função das terapias pode ser observado na tabela 2.

Mecanismos de resistência dos ITK de EGFR

Mutações no éxon 20/códon 790 (T790M) são identificadas em aproximadamente 60% dos casos de resistência secundária aos ITK, sendo raramente encontradas em casos de refrataridade ou resistência primária. Alterações genéticas menos frequentes associadas ou não à mutação T790M que conferem resistência aos ITK de EGFR são amplificação de HER2 e MET.

Mutações em KRAS conferem uma menor resposta à inibição do EGFR, tanto em sua porção extracelular, alvo do anticorpo monoclonal-cetuximabe, quanto em seu domínio de tirosina Kinase alvo dos ITK de EGFR, Erlotinibe e Gefitinibe.

CPNPC com mutação em ALK

Pacientes não tabagistas com CPNPC que não apresentam mutações no gene EGFR são não respondedores à terapia com inibidores de tirosina–quinase (ITK). Recentemente, foi sugerido que pacientes com adenocarcinoma, não tabagistas e negativos para a mutação de EGFR, apresentam o gene de fusão EML4-ALK. A mutação em EGFR e a fusão EML4-ALK são eventos mutuamente exclusivos definindo, portanto, dois grupos biologicamente distintos de CPNPC. Pacientes portadores de alterações no gene ALK se beneficiam do uso do inibidor-alvo específico para ALK, como o Crizotinibe.

Em novembro de 2016, o FDA aprovou como companion diagnostic, o teste imunohistoquímico anti ALK da Ventana, clone D5F3 para avaliar o status de ALK em adenocarcinomas pulmonares. Esse teste teve uma concordância de 98% com o FISH.

Procedimentos diagnósticos para o CPNPC

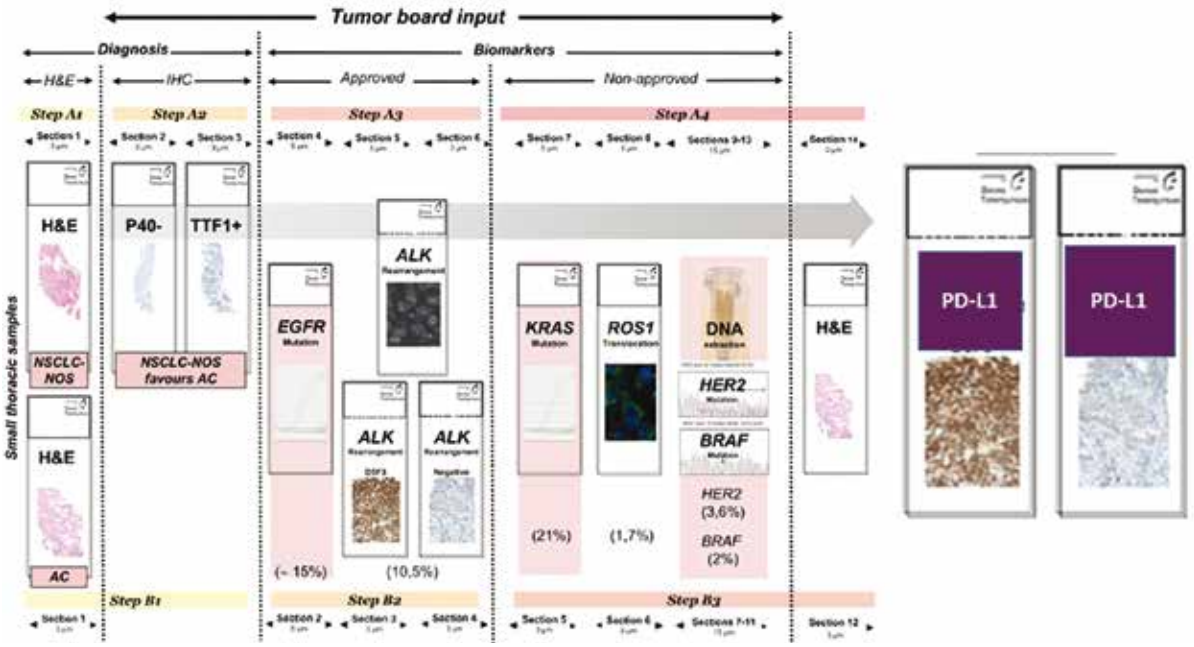
Como resultado da reunião recente de experts europeus, recomendações sobre o procedimento diagnóstico ideal para o câncer de pulmão não pequenas *células* foram emitidas. Tomando como base a não existência em toda a Europa de um consenso para a formatação de um algoritmo diagnóstico ideal para o CPNPC, procedimentos operacionais padrões, englobando desde a fase pré-analítica ao diagnóstico molecular, foram propostos. Para a otimização do diagnóstico, base para o tratamento-alvo específico do CPNPC, duas premissas foram consideradas, a adaptação das ferramentas diagnósticas, a realidade de cada laboratório e uma abordagem multidisciplinar.

A maioria dos pacientes com suspeita de câncer de pulmão requerem biópsia de tecido para confirmação diagnóstica. Para aqueles pacientes com doença avançada, a grande maioria, a terapia-alvo específica é a escolha. Para que essa terapia possa ser aplicada corretamente, a análise de mutações no gene EGFR, de inversões ou translocações no gene ALK, é mandatória. Dentre os vários alvos de terapias utilizadas em ensaios clínicos, a análise do receptor tirosina quinase ROS1 compõe o painel mínimo necessário para uma melhor escolha terapêutica. Uma revisão das recomendações para a boa prática laboratorial necessária para a qualidade do diagnóstico nos CPNPC foi recentemente apresentada.

Algoritmos de referência, levando-se em conta o custo e o benefício, para os procedimentos de diagnóstico foram definidos para introdução na rotina atual. Esses, envolvem exames reflexos, isto é, cortes do bloco de parafina são armazenados para uma futura realização de imuno-histoquímica (IHC) e/ou testes moleculares, a existência de exames-reflexos encurta o tempo de liberação do resultado e ajuda a preservar o tecido do material parafinado (FIP).

Os cortes teciduais são utilizados de acordo ao seguinte algoritmo:

Figura 3. Fluxograma do diagnóstico histológico e molecular do câncer de pulmão



Dietel M, *et al.* Thorax 2015;0:1–8. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206677

Rota A: indicada para os casos que requerem IHC; Rota B: para casos nos quais a coloração com HE é suficiente para a classificação. A frequência relativa das diferentes alterações moleculares é apresentada em parêntesis. AC, adenocarcinoma; ALK, anaplastic lymphoma kinase; BRAF, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1; EGFR, epidermal growth factor receptor; HER, human epidermal growth factor receptor; KRAS, V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; NSCLC-NOS, CPNPC-NOS; e ROS1, ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase.

1. Coloração com HE, PAS e IHC para caracterização de TTF1, p40 ou p63, complementados com CK5/6, napsina ou CK7, se necessário. Essa etapa estabelece o diagnóstico e classifica histologicamente os CPNPC em adenocarcinoma, escamoso ou não classificável (CPNPC-NOS);

2. Em paralelo, IHC para avaliação da expressão de ALK, c-MET, ROS pode ser realizada;

3. FISH para avaliação de amplificação de EGFR e para ALK são considerados mandatórios na rotina;

4. A análise de RAS, BRAF, MET, ROS e RET pode ser considerada, se clinicamente apropriada. Em particular, a análise de ROS1 deve ser ressaltada devido a resultados terapêuticos promissores contra esse alvo. Até o momento, o FISH é a metodologia de escolha;

5. A coocorrência de mutações está associada à resistência a ITK de EGFR. Várias tecnologias podem ser utilizadas para a análise de mutações em EGFR, são elas: sequenciamento por Sanger, piro-sequenciamento ou sequenciamento de próxima geração (NGS). A análise de rearranjos em ALK pode ser por FISH, IHC, RT-PCR ou NGS. Nos EUA, a metodologia de escolha é o FISH. Esse algoritmo pode ser observado na figura 3.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Mutações oncogênicas diretoras (drivers) são detectadas em 64% dos pacientes com câncer de pulmão não pequenas células, em torno de 40% dos pacientes com CPNPC podem ser tratados com terapia-alvo específica, esses têm uma sobrevida livre de progressão maior (>1 ano) quando comparados àqueles não tratados com terapia-alvo ou àqueles pacientes negativos para mutações diretoras.

A imunoterapia tem se tornado uma modalidade crucial para o tratamento do CPNPC. Recentemente, dois imunecheckpoints, PD-1 e PD-L1, surgiram como importantes alvos para a imunoterapia. A correlação entre expressão de PD-1/PD-L1 expressão e status de EGFR ainda é controversa.

A imunoterapia pra tratamento de câncer de pulmão já é uma realidade com excelentes resultados duradouros tanto na primeira como na segunda linha de tratamento. A testagem da expressão de PD-L1 é uma ferramenta importante para avaliar a predição de resposta aos imunoterápicos anti PD-1 e anti PD-L1. A literatura mostra que existe uma maior associação com a expressão do PD-L1 e a resposta aos imunoterápicos nos adenocarcinomas que nos Carcinomas epidermóides.

A ciência está numa corrida pela busca de biomarcadores que aumentem a predição de resposta aos imunoterápicos como o uso de painéis de expressão de genes associados à inflamação e expressão de outros ligantes do PD-1 como o PD-L2. A imunoterapia é a grande novidade e o futuro da oncologia, um mundo interessante que precisaremso desvendar dia-a-dia. ■

REFERÊNCIAS
www.dasa.com.br/referencias

***Cristovam Scapulatempo Neto**
Gerente médico da Patologia Molecular da DASA.;
Doutorado em ciências pelo Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo (USP).

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

Dr. Gustavo Guida*

Testes genéticos de avaliação de transtorno global do desenvolvimento

Investigação genética do autismo: Novas ferramentas diagnósticas e seus resultados

Os transtornos do espectro autista (TEA) intrigam os que convivem com esses pacientes há um longo tempo. Um dos pontos mais desconfortáveis para os familiares e médicos é a questão do diagnóstico etiológico. Como boa parte das doenças neuropsiquiátricas, o diagnóstico baseia-se em um conjunto de critérios de desempenho e comportamento. Considerando que muitos desses comportamentos são encontrados em crianças que terão um desenvolvimento normal, a ausência de marcadores palpáveis torna-se ainda mais incômoda.

Historicamente, para a maioria dos pacientes, nenhum exame revelava qual a causa biológica – ou se esta existia. A suspeita sobre causas genéticas era grande – principalmente pela associação de algumas síndromes bem conhecidas e documentadas com uma ocorrência aumentada de TEA, porém, a maioria dos autistas, ao ser submetido pela investigação habitual sugerida – cariótipo, neuroimagem, Fraxa – não alcançava um diagnóstico.

Já nos últimos anos, ganhamos acesso a uma gama de novos exames com um papel instrumental na possibilidade de um diagnóstico biológico, na compreensão das causas e neurobiologia do autismo, e no aconselhamento genético das famílias afetadas.

O carro-chefe desta nova abordagem para o diagnóstico dos TEA é a hidridização genômica comparativa – array-CGH. Já considerado pela Academia Americana de Pediatria como o exame de primeira linha para a investigação dos atrasos de desenvolvimento sem causa definida e para os TEA, ele oferece a mais meticulosa abordagem citogenética disponível atualmente. Capaz de detectar microdeleções, microduplicações, e praticamente todas as alterações cariotípicas significativas para a investigação do autismo, foi recentemente adicionado ao rol de cobertura obrigatória da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Porém, ainda se exige a realização prévia do cariótipo e a observação de alguns critérios para sua cobertura (Tabela 1).

Usando essa abordagem, já foram reportadas taxas de diagnóstico entre 2%,3%-12,7% (Nicholl, 2014), 20% (Roberts, 2014) até 28% (Kousoulidou, 2013). A justificativa para tal disparidade de resultados é simples – a utilização de arrays com quantidades diferentes de sondas moleculares. O aumento do número de sondas levou a um ganho considerável de capacidade diagnóstica entre os diferentes grupos, fato a ser levado em consideração ao solicitar e avaliar os resultados. Os melhores resul-

tados publicados foram obtidos ainda com versões do array-CGH utilizando 400 mil sondas; hoje, já são utilizados arrays com até 1 milhão e 700 mil sondas.

O diagnóstico das anomalias cromossômicas submicroscópicas, enquanto não possuindo o potencial de modificar o tratamento atual desses pacientes, permite uma maior vigilância quanto a possíveis agravos de saúde previsíveis e o aconselhamento genético dos familiares quanto ao risco de recorrência.

Uma segunda vertente de investigação muito promissora é a dos erros inatos do metabolismo. Com o aumento de doenças testadas com a espectrometria de massas em tandem, (MS/MS), a maior confiabilidade e reprodutibilidade da técnica, e a melhor compreensão dessas doenças, mudou-se um antigo paradigma. Era corrente considerar que a investigação metabólica tinha um papel quase irrelevante na abordagem do autismo, devido ao baixíssimo número de diagnósticos que permitia, frente à complexidade envolvida em sua realização. Usando um MS/MS técnica já utilizada rotineiramente no Brasil, Spilioti e Evangeliou, em 2013, alcançaram 2,7% de diagnóstico conclusivo em um grupo de 187 autistas gregos. Além destes, mais 7% tiveram perfis sugestivos para erros inatos do metabolismo, não obtendo, porém, sua confirmação diagnóstica. Para os pacientes identificados com essa abordagem, além da óbvia vantagem do aconselhamento genético para as doenças autossômicas recessivas, existe a possibilidade real de reversão dos sintomas com manejo dietético. No grupo investigado, cerca de dois terços dos que tiveram padrões compatíveis com erros metabólicos obtiveram melhora com o manejo apropriado, ressaltando-se o caso de um paciente que apresentou completa normalização do comportamento e desenvolvimento após reposição de biotina. Mesmo considerando que resultado tão positivo é uma exceção, houve ganhos consideráveis para outros pacientes, e a possibilidade de um benefício tão espetacular não deve ser descartada levianamente.

Uma terceira ferramenta, de surgimento mais recente, vem-se mostrando extremamente promissora na elucidação dos transtornos neuropsiquiátricos e na compreensão dos mecanismos envolvidos no autismo. O sequenciamento completo do exoma, ou seja, a análise da sequência de todos os éxons – regiões do DNA que são efetivamente transcritas – vem revelando novos grupos de genes envolvidos

Tabela 1. Obrigatoriedade de cobertura – array CGH

Paciente com cariótipo normal e pelo menos 2 das seguintes características	Deficiência intelectual ou atraso neuropsicomotor
	Presença de 1 anomalia congênita maior ou 3 anomalias menores
	Baixa estatura ou déficit pondero estatural
Paciente com cariótipo alterado, preenchendo um dos critérios	Cromossomo marcador
	Translocação aparentemente balanceada, com fenótipo alterado
	Material cromossômico adicional de origem indeterminada
Pais de paciente que já tenha tido uma variação identificada no array-CGH	

> O carro-chefe desta nova abordagem para o diagnóstico dos TEA é a hidridização genômica comparativa – array-CGH.
> Já considerado pela Academia Americana de Pediatria como o exame de primeira linha para a investigação dos atrasos de desenvolvimento sem causa definida e para os TEA, ele oferece a mais meticulosa abordagem citogenética disponível atualmente

Tabela 2.

	Array CGH	Exoma
Técnica	Co-hibridização	Sequenciamento
O que avaliam	Deleções ou duplicações de trechos cromossômicos	Mutações pontuais
Referência	Uma amostra de controle	Sequência padrão
Regiões cobertas	1.7 milhões de sondas – 1 a cada 3 kb exônicos	180 mil exóns (1% do total de sequências)

no autismo e ajudando a compreender a razão de tanta variabilidade. O papel crucial dos genes reguladores dos canais de íons, com reflexo desde a morfologia celular até a expressão de outros genes, incluindo a geração de potenciais de ação, é cada vez mais relevante para as epilepsias, o autismo e as desordens neuropsiquiátricas em geral. Mesmo doenças cuja etiologia era considerada já bem esclarecida, revelaram uma imensa riqueza de nuances à análise do exoma.

Tanto para a síndrome de Rett (Grillo, 2013) quanto para a síndrome do X-Frágil (Steinberg, 2013), síndromes genéticas clássicas e já investigadas rotineiramente nos TEAs, o exoma acabou por confirmar a importância de genes moduladores. No caso da síndrome de Rett, cuja causa monogênica – mutações no gene MECP2 – já era amplamente conhecida, também se sabia que existe uma fraca relação entre genótipo e fenótipo – pacientes com a mesma mutação muitas vezes evoluem de forma muito diversa. O exoma em pares de irmãs portadoras da mesma mutação e sem inativação preferencial do X indicou grupos de genes responsáveis pelas características típicas da doença, e um conjunto de variantes de modulação da resposta imune capaz de induzir a um fenótipo muito mais brando – a forma Zappella da síndrome de Rett. Já o exoma de pacientes com TEA, quando foi direcionado para a avaliação da expressão espaço-temporal dos genes-alvo do FMR1, mostrou que alguns desses subgrupos contribuem para as manifestações do autismo, num padrão de "múltiplos-hits". Isto é, mutações em múltiplos genes, as quais isoladamente não teriam significado clínico, uma vez associadas acabam por amplificar os efeitos deletérios de cada uma delas e provocando a clínica do chamado espectro autista. Dessas mutações, algumas sugerem alvos de interesse especial para a terapia farmacológica, podendo dar origem a terapias específicas e mais eficientes.

Mesmo que com o auxílio dessas três abordagens muitos pacientes com os TEA ainda permanecerão sem diagnóstico etiológico. Essa limitação demonstra que ainda há espaço para a investigação de novos mecanismos que possam estar na origem das doenças neuropsiquiátricas e dos transtornos do desenvolvimento. Mas a parcela que alcançar um diagnóstico por meio dessa nova abordagem será beneficiada pelo aconselhamento genético dos familiares e pela melhor compreensão e individualização de sua condição. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dr. Gustavo Guida**
Membro Titular SBGM;
Consultor para Genética
Médica Grupo DASA;
Médico Geneticista CEGEMERJ.

Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto*

A genética e as neoplasias encefálicas

Nova classificação WHO 2016 para tumores do SNC – Uma abordagem genético-molecular

UMA GRANDE MUDANÇA NA ABORDAGEM DIAGNÓSTICA DOS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) vem ocorrendo. Diferente da classificação de 2007 dos tumores do SNC da Organização mundial da Saúde (OMS), a de 2016 incorpora alterações genético-moleculares. Essa é a primeira vez que alterações moleculares são utilizadas em associação às características histológicas para definir neoplasias encefálicas, o que nos coloca a questão de como o diagnóstico dos tumores do SNC será estruturado na era genômica-molecular. O que se espera é que uma classificação que associe histologia à genética seja capaz de discriminar entidades clínicas mais homogêneas de tumores do SNC.

Até a classificação atual utilizávamos as alterações moleculares como biomarcadores de prognóstico e preditivos da resposta terapêutica. A principal mudança ocorrida na OMS-2016 foi a classificação de gliomas difusos, meduloblastomas e outros tumores embrionários em função de alterações moleculares para a definição de entidades clínicas específicas.

As novas entidades classificadas de acordo com as características histológicas e moleculares são: os gliomas difusos, classificados de acordo com o status mutacional do gene IDH e a codeleção de 1p/19q; os gliomas de linha média, classificados quando a presença de alterações somáticas na histona H3 (fusões ou mutações H3K27M) é detectada; o ependioma, sempre quando a fusão para Rela for positiva; e os meduloblastomas divididos em que quatro subgrupos genéticos de acordo com assinaturas de expressão similares, ou não, as vias de WNT e SHH, nesse último complementado com o status mutacional do gene TP53, além dos grupos designados numericamente em grupo 3 e 4.

A mudança na classificação da OMS se deu após vários consensos e foi fortalecida pela apresentação dos resultados do TCGA (The Cancer Genome Atlas). Nesse trabalho, uma análise não supervisionada de dados genômicos, de 278 casos de gliomas (englobando grau II e III da classificação da OMS de 2007), definiu três *clusters* moleculares discriminados de acordo com o status mutacional de IDH (mutado ou não mutado) e codeleção de 1p /19q (presente ou ausente): o primeiro com IDH mutado e com codeleção de 1p/19q presente; o segundo com IDH mutado e codeleção 1p/19q ausente; e um terceiro com IDH não mutado (*wildtype* ou selvagem).

As características histológicas dos grupos foram anotadas. Observou-se que o grupo 1 era constituído majoritariamente por oligodendrogliomas, os grupos 2 e 3 por astrocitomas e que os oligoastrocitomas eram distribuídos por todos os três grupos. Em relação à classificação por grau, o alto grau III predominou no grupo 3, com IDH selvagem, e o grupo 2 comportou gliomas difusos de grau maior quando comparado ao grupo 1.

Na análise do TCGA foi observada a alta frequência de mutações nos genes TP53 e ATRX no grupo 2 (IDH mutado e codeleção 1p/19q ausente). Também foi observado que virtualmente todos os gliomas difusos sem mutação em ATRX apresentavam mutações no promotor de Tert (grupo 1 e 3), e que histologicamente o grupo 3 (IDH selvagem) era constituído por glioblastomas (GBM) primários. Os GBMs assim caracterizados também apresentaram mutações somáticas para os genes PTEN, PIK3CA, NF1 e EGFR.

O resultado mais importante da análise do TCGA foi estabelecer que gliomas difusos, quando separados em subtipos moleculares, discriminados pelo status mutacional de IDH e pela codeleção 1p/19q, definem grupos mais homogêneos em relação a apresentação clínica e desfecho, quando comparados à classificação baseada na histologia e grau da OMS 2007.

Considerando-se o agrupamento histológico e por grau da OMS 2007, com exceção dos GBMs, a sobrevida média dos gliomas difusos varia de um a 15 anos. Os astrocitomas grau II "indolentes" progridem rapidamente para GBM, e apresentam sobrevida média de pouco mais que dois anos, enquanto os astrocitomas grau III podem permanecer estáveis por anos.

Em contraste, quando o desfecho é avaliado em relação aos grupos moleculares 1, 2, 3, temos um prognóstico mais adverso nos gliomas com IDH selvagem, independente do grau: os GBMs com IDH selvagem apresentam sobrevida média de um ano; os gliomas de grau baixo e intermediário (grau II e III da OMS-2007) com IDH selvagem, sobrevida média de 1,7 anos, pouco maior ou similar a GBMs com IDH mutado (2,1 anos), enquanto, os grupos 1 e 2 com IDH mutado, com ou sem codeleção, apresentam sobrevida média de seis a oito anos.

Em resumo, tem-se que quando discriminados molecularmente os oligodendrogliomas são caracterizados por IDH mutado e codeleção 1p/19q, os astrocitomas por IDH mutado e ausência de codeleção 1p/19q, assim como os GBMs secundários, e os GBMs primários por IDH selvagem.

Dessa forma, temos que os gliomas difusos na OMS 2016 são discriminados nos seguintes subtipos moleculares: astrocitomas difusos IDH mutado ou não mutado; astrocitomas anaplásico IDH mutado ou não mutado; glioblastomas com IDH mutado(GBM primário); GBM com IDH não mutado (GBM secundário); glioma de linha média H3K27M

"Em resumo, tem-se que quando discriminados molecularmente os oligodendrogliomas são caracterizados por IDH mutado e codeleção 1p/19q, os astrocitomas por IDH mutado e ausência de codeleção 1p/19q, assim como os GBMs secundários, e os GBMs primários por IDH selvagem"

positivo; oligodendrogliomas com IDH mutado e codeleção de 1p/19q; e oligodendroglioma anaplásico com IDH mutado e codeleção de 1p/19q. É de se notar que, na OMS 2016 a categoria mista oligoastrocitoma praticamente desaparece, e só existe quando os testes moleculares não foram realizados, ou seja, nos casos NOS (*not otherwise specify*).

Atualmente, algoritmos diagnósticos com várias camadas de informação são propostos para classificação dos gliomas difusos. A abordagem tem início com a definição do status mutacional de IDH (AcMo específico para mutação R132H) e expressão de ATRX, se IDH mutado e ATRX positivo por imuno-histoquímica (IHC), o que significa a não existência de mutação, segue-se para o teste de codeleção 1p/19q, este se positivo é indicativo de oligodendrogliomas grau II-III. Por outro lado, ATRX negativo (presença de deleção) é indicativo de astrocitomas grau II-III ou GBM secundário (figura 1).

Casos com IDH selvagem e codeleção 1p/19q presente são sugestivos de oligodendrogliomas grau II-III, em contraste se a codeleção 1p/19q está ausente, sugere-se partir para a análise molecular, porque a IHC utiliza um anticorpo específico para a mutação R132H em IDH1, não contemplando mutações em IDH2 (R140 e R172) e mutações menos frequentes em IDH1 (G123, G97 e V71). Quando o resultado da análise molecular de IDH é mutado, é sugestivo de astrocitoma II,III ou GBM secundário, já, se selvagem, é indicativo de glioblastoma primário.

ANÁLISE GENÉTICO MOLECULAR:

Após separação dos blocos e revisão por nossos patologistas, a análise molecular tem início com a extração de DNA.

CODELEÇÃO 1P/19Q E O DIAGNÓSTICO DE OLIGODENDROGLIOMAS

Estudos recentes mostram que a codeleção apresenta valor para a classificação quando esta for total, perdas parciais nas regiões 1p/19q não apresentam o mesmo valor prognóstico favorável quando comparadas à deleção completa da região 1p/19q.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a detecção da codeleção 1p/19q, dentre as mais utilizadas estão a citogenética molecular ou Fish, a análise de microssatélite por PCR e o o MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). O Fish é uma técnica focal e, portanto, não discrimina se a perda na região 1p/19q é parcial ou completa; a análise de microssatélite por PCR, seguida de análise de fragmentos também é uma técnica focal. Além disso, é intensiva no uso de DNA, e requer vários PCRs, sangue periférico, além do tecido tumoral emblocado em parafina.

Assim, o MLPA é a única técnica capaz de discriminar se a perda é parcial ou completa, sendo, portanto, a abordagem atual da DASA para a classificação de gliomas difusos. O MLPA analisa a variação do número de cópias em toda a região 1p/19q, sendo, portanto, uma técnica global, além de incorporar em um único ensaio a análise do status mutacional de IDH, englobando todas as mutações de IDH1 (R132C e R132H) e IDH2 (R172K e R172M). Um caso de glioma difuso com codeleção completa de 1p/19q e mutação heterozigota em IDH1 pode ser visto na Figura 3.

Figura 1. Modificado de Acta Neuropathol2014

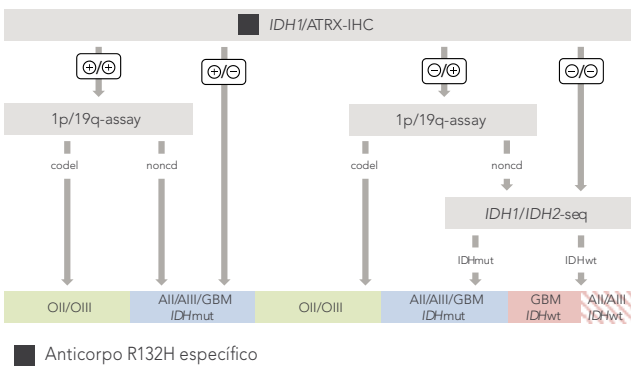
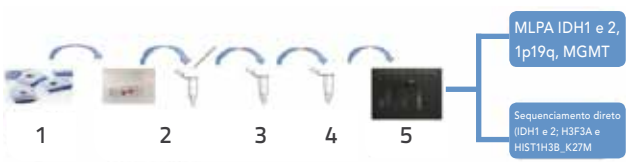
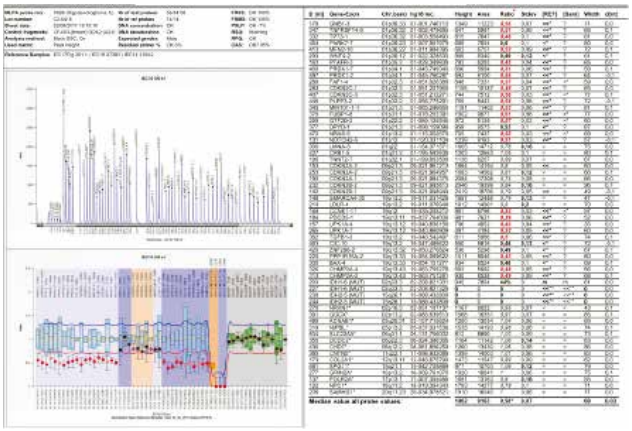


Figura 2. Workflow da análise genético-molecular



1. Blocos separados e lâminas revisadas por patologistas
2. Tecido raspado em tubo de eppendorff de acordo com área marcada
3. Desparafinização com xilol e etanol
4. Extração de DNA com QiaAmp Dna MicroKit
5. Avaliação da qualidade do DNA – gel e Nanodrop

Figura 3. Deleção Total 1p/19q e Mutação em IDH1



Laudo INTEGRADO
Glioma Difuso
OMS Grau II
Status IDH: Mutado (IDH1; R132H)
Status 1p/19q: Positivo (Codeleção presente)

Existem diferentes técnicas para a avaliação do status de metilação do MGMT, dentre elas, o PCR metilação específico (MS-PCR) e o MLPA. A abordagem atual da DASA para a avaliação da metilação do MGMT é o MS-MLPA, que detecta o status da metilação ao longo de toda a região do promotor de MGMT, em contraposição ao MS-PCR, que além de não ser um método quantitativo analisa somente algumas regiões do promotor.

OS SEGUINTES TESTES ESTÃO DISPONÍVEIS PARA A ANÁLISE DAS NEOPLASIAS ENCEFÁLICAS:

- Teste molecular para gliomas difusos: IDH-1, IDH2 e pesquisa de codeleção de 1p/19q
- Pesquisa de Metilação do GENE MGMT.

HIPERMETILAÇÃO DO GENE MGMT É MARCADOR PROGNÓSTICO E PREDITIVO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA A AGENTES ALQUILANTES

Agentes alquilantes adicionam grupamentos alquil ao DNA (ex: CH3). A presença dos grupamentos alquil disparam vias de reparo do DNA induzindo à apoptose. Entretanto, a presença da metilguanina ativa a enzima MGMT(O6-metilguanina-DNA metiltransferase), que retira o grupamento metil da guanina. Dessa forma, a enzima MGMT funcional impede a ação de drogas alquilantes, causando uma resistência a esse tipo de quimioterápico.

Em contraste, a metilação do promotor MGMT, com consequente silenciamento gênico, inibe a ação da enzima MGMT, conferindo sensibilidade a agentes alquilantes.

Dessa forma, o padrão de metilação do promotor de MGMT é o marcador de maior valor prognóstico e preditivo da resposta ao tratamento com radioterapia combinada com os quimioterápicos alquilantes, como, por exemplo, a Temozolomida (TMZ) em gliomas. Pacientes com hipermetilação na região promotora do gene MGMT apresentam melhor resposta terapêutica ao tratamento com o TMZ. Assim, o silenciamento epigenético do gene MGMT por metilação é associado com maior sobrevida global.

> Estudos recentes mostram que a codeleção apresenta valor para a classificação quando a mesma for total, perdas parciais nas regiões 1p/19q não apresentam o mesmo valor prognóstico favorável quando comparadas a deleção completa da região 1p/19q

Dra. Ilana Zalcberg Renault, Dr. Cristovam Scapulatempo Neto e Dra. Flora Finguerman*

Câncer de mama e ovário hereditários

Associações entre a predisposição ao câncer de mama: Painéis gênicos

DESCOBRIR AINDA JOVEM SE VOCÊ TEM ALTO RISCO DE DESENVOLVER CÂNCER NO FUTURO. Esse é um dos recursos mais avançados da medicina de precisão voltada para a detecção precoce de doenças. O diagnóstico é possível graças ao surgimento de novos exames e análises genômicas, que ampliam a capacidade de prevenção de doenças e direcionam tratamentos mais específicos.

"Às vezes, o primeiro dever de uma pessoa inteligente é restabelecer o óbvio." (George Orwell, 1938)

Nos dias de hoje, o conceito de que o câncer é uma doença genética nos parece óbvio, mas não foi assim até a metade do século 20. Embora todos os cânceres afetem genes, a grande parte não apresenta um padrão de herança mendeliano.

Somente de 5% a 10% de todos os cânceres são hereditários ou familial, o que significa dizer que uma única variação em um ou poucos genes se traduz em doença. Ainda assim, o câncer familial tem uma prevalência global de 300 milhões de casos, sendo a maioria deles deficientemente diagnosticado.

CÂNCERES DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS (HBOC): 1- BRCA1-BRCA2 (1994-2013) PAINEL NGS BRCA1/2 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE GENES

Diversos estudos clínicos estabeleceram ao longo das últimas décadas uma relação entre determinados genes e a predisposição a tipos específicos de câncer. A associação entre mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 e a predisposição ao câncer de mama e ovário hereditário (HBOC) ficou clara, tendo sido esse o marco para o início de testes genéticos preditivos.

Portadores de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 apresentam um risco significativamente maior para o desenvolvimento de vários tumores e em idade jovem. O risco de a presença de uma mutação em BRCA1 e BRCA2 resultar em câncer (penetrância), encontrado em estudos realizados em famílias com múltiplos indivíduos afetados, é de 80% a 90%. Entretanto, estudos em indivíduos portadores de mutação em BRCA1 ou BRCA2 não selecionados pela história familiar nem pelo aparecimento precoce do câncer estimam um risco cumulativo vital para o câncer de mama de 57% e 49%, e para ovário de 40% e 18%, respectivamente.

A identificação de portadores de mutações em BRCA1-2 permitiu o delineamento de estratégias específicas para a redução do risco de câncer de mama e ovário. Essas estratégias incluem a mastectomia, salpingo-ooforectomia, além de protocolos de triagem que incluem ressonância.

A partir de 2013, o aumento da capacidade do sequenciamento genético, obtido com as novas tecnologias (NGS), combinado com a diminuição do custo do teste, tem alterado a política regulatória e a prática da oncologia clínica. A acessibilidade a testes genéticos para a população tem permitido a identificação de novas variantes, associadas a diferentes etnias, fato relevante para países miscigenados como o Brasil. Isso tem diminuído a probabilidade do recebimento de um resultado inconclusivo (definido como variante de significado incerto-VUS) pelas pacientes submetidas ao sequenciamento completo dos genes BRCA1-2.

Mutações nos genes BRCA são responsáveis por 5% dos cânceres de mama e de 10% a 15% dos cânceres de ovário. Pacientes com história de câncer de mama e/ou ovário em membros da família estreitamente relacionados são portadores de câncer de mama familial (CMF). O fenótipo típico de uma família com HBOC é constituído por múltiplos casos de cânceres de mama e/ou ovário em mu-

lheres ou mesmo em homens, câncer de próstata, estomago, pâncreas, dentre outros. Entre as pacientes com história de CMF, de 20% a 30% apresentam mutações em BRCA1/2.

Outros genes de penetrância alta, moderada ou mesmo baixa explicam até 20% do CMF. Cerca de 60% dos pacientes em que a suspeita de hereditariedade é grande são negativos para mutações em BRCA1/2. Dessa forma, é importante estender a avaliação genômica por painéis de NGS para pacientes com CMF que não apresentam mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2. Além da HBOC, são hoje descritas mais de 300 diferentes síndromes de câncer hereditário.

OUTRAS SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA

PAINEL NGS PARA MAMA ALTO RISCO HEREDIX- 6 GENES BRCA1 - BRCA2 - TP53 - CDH1 - PTEN - STK11

Mutações em outros genes de alta penetrância (TP53-CDH1-PTEN-STK11), associados a síndromes familiares em que a incidência de câncer de mama se encontra aumentada, são responsáveis por 5% dos CMF. Entretanto, nessas síndromes, o câncer de mama não é o fenótipo primário observado.

Famílias com síndrome de Li-Fraumeni apresentam câncer de mama em idade precoce. Ocorrência de câncer de mama, idade ≤ 35 anos e negatividade para mutações em BRCA sugerem a investigação de mutação no gene TP53. Outros genes associados a síndromes familiares são: CDH1 (câncer gástrico difuso hereditário), PTEN (síndrome de Cowden) e STK11 (síndrome de Peutz-Jeghers).

CORRELAÇÃO FENÓTIPO E GENÓTIPO NAS SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA

Fenótipo	Genótipo
Câncer de mama triplo-negativo e idade ≤ 60 anos	BRCA1/2
Câncer triplo positivo e idade ≤ 35	TP53/Síndrome de Li-Fraumeni
Câncer de mama do tipo lobular, com história familiar para câncer gástrico	CDH1
Câncer de mama associado a lesões mucocutâneas, macrocefalia, câncer de endométrio ou câncer de tireoide papilífero ou folicular	PTEN

FENÓTIPOS SOBREPOSTOS E ANÁLISE MOLECULAR COM PAINÉIS NGS PARA GENES ASSOCIADOS AO CÂNCER HEREDITÁRIO:

PAINEL DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS - 20 GENES

ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53

A identificação de outros genes, de penetrância moderada ou segregação incompleta, que atribuem suscetibilidade aumentada ao CMF, auxiliam na investigação do risco familiar para o câncer de mama ou ovário.

“Mutações em outros genes de alta penetrância (TP53-CDH1-PTEN-STK11), associados a síndromes familiares em que a incidência de câncer de mama se encontra aumentada, são responsáveis por 5% dos CMF. Entretanto, nessas síndromes, o câncer de mama não é o fenótipo primário observado”

O câncer de mama pode estar ligado a diversas síndromes de câncer familial, assim, decidir que genes devem ser testados pode se tornar uma tarefa difícil. A seleção de painéis gênicos, baseados na literatura recente, inclui a seleção de genes associados a síndromes genéticas com componentes de câncer de mama ou ginecológico.

Na síndrome de Lynch, o risco para o desenvolvimento de câncer colorretal (CCR) é de 80%. A síndrome é também associada a outros tipos de cânceres, como, por exemplo, o câncer de endométrio nas mulheres. Os genes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e EPCAM envolvidos em vias de reparo de DNA (MMR), quando mutados ou silenciados, são condição subjacente a esses fenótipos clínicos.

Genes de risco moderado para câncer de mama ou ginecológico (CHEK2 e ATM) e genes que atuam de forma análoga BCRA1/2, em vias de reparo do DNA (PALB2 e genes da via da anemia de Fanconi), foram recentemente incluídos em painéis NGS para avaliação de câncer hereditário.

Alguns desses genes resultam em fenótipos sobrepostos e, portanto, podem estar alterados em diferentes tipos de cânceres, como, por exemplo, BRCA2 e PALB2 em melanoma e pâncreas; ATM em mama e pâncreas; CHECK2 em CCR e mama; MMR em CCR, mama e pâncreas; BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, MRE11A, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11 em ovário e mama; PTEN, endométrio e mama; MMR endométrio e ovário; além dos genes TP53, ATM, CDH1 e CHECK2 específicos ao de mama.

Dessa forma, o uso de painéis que incluam genes de alta e moderada penetrância, cuja alteração é subjacente a diferentes tipos de câncer (ovário, mama, endométrio, cancercolorretal, pâncreas e melanoma), é hoje indicado.

Entretanto, alguns pontos devem ser considerados na escolha e análise de painéis gênicos: a ausência de critérios fenotípicos; a antecipação de dados inesperados; o número aumentado de variantes de significado incerto (VUS) em genes menos conhecidos do que BRCA1 e BRCA2; a penetrância variável de diferentes mutações em um mesmo gene; a possível variação da prevalência e penetrância entre etnias; e a aferição do risco cumulativo residual para o câncer de mama e ovário, em genes ainda pouco conhecidos, em pacientes "negativos" para uma mutação familiar já identificada.

Dessa forma, a abordagem atual da DASA para a avaliação de cânceres hereditários consiste na utilização de painéis NGS alvo-específicos como metodologia de escolha, por acreditar que a solicitação do exame adequado depende de um contexto clínico específico. O uso de painéis muito extensos ou de exomas em indivíduos com fenótipo e história familiar conhecidos pode acarretar em um aumento do número de variantes de significado incerto (VUS) ou variantes sem relevância clínica, o que dificulta a determinação de um procedimento clínico adequado.

Nessa perspectiva, acreditamos que nem sempre o maior (exoma) é o melhor (sequenciamento alvo-específico), porque cada base necessita ser lida várias vezes (entre 50 a 70 vezes) para a obtenção de uma chamada de variantes adequada. Nesse sentido, estabelecemos uma parceria com empresa especializada em bioinformática (Sophia_Genetics), garantindo a qualidade e o uso de algoritmos específicos para a chamada de variantes. Finalmente, para a classificação de variantes e interpretação clínica de cada caso, a integração de nossa equipe, formada por geneticistas moleculares e clínicos, é fundamental, sendo a elaboração do laudo de responsabilidade desse grupo de trabalho multidisciplinar com foco nos cânceres hereditários.

PAINÉIS MULTIGÊNICOS FORAM DESENVOLVIDOS PARA VÁRIAS CONDIÇÕES CLÍNICAS. OS SEGUINTES PAINÉIS NGS PARA CÂNCERES HEREDITÁRIOS SERÃO DISPONIBILIZADOS:

- PAINEL BRCA1/2
- PAINEL MAMA HEREDITÁRIO ALTO RISCO - 6 genes
- PAINEL DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS - 21 genes
- PAINEL PARA SÍNDROME DE LYNCH (HNPCC) - 5 genes
- PAINEL PARA CÂNCER COLORRETAL COM POLIPOSE - 2 genes
- PAINEL DE CÂNCER COLORRETAL EXTENSO - 14 genes
- PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO COMPLETO - 27 genes
- PAINEL DE CÂNCER ENDOMETRIAL - 12 genes

Nome do Painel	Plataforma NGS	Genes	Cobertura média	Tipo de amostra
BRCA1-2 NGS SEQUENCIAMENTO COMPLETO	Ion Torrent (PGM)	BRCA1; BRCA2	>250X	Sangue Periférico
PAINEL MAMA HEREDITÁRIO ALTO RISCO	Illumina (MiniSeq)	BRCA1,BRCA2, TP53 , CDH1, PTEN, STK11	>200X	Sangue Periférico
PAINEL DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS	Illumina (MiniSeq)	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2	>200X	Sangue Periférico
PAINEL DE CÂNCER ENDOMETRIAL	Illumina (MiniSeq)	BRCA1, BRCA2, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PALB2, PMS2, PTEN, TP53.	>200X	
PAINEL PARA LYNCH (HNPCC)	Illumina (MiniSeq)	EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.	>200X	Sangue Periférico
PAINEL PARA CÂNCER CCR COM POLIPOSE	Illumina (MiniSeq)	APC, MUTYH,	>200X	Sangue Periférico
PAINEL CÂNCER COLORRETAL	Illumina (MiniSeq)	APC, ATM, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PMS2CL, PTEN, STK11, TP53, XRCC2	>200X	Sangue Periférico
PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO COMPREENSIVO	Illumina (MiniSeq)	APC, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, FAM175A, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PIK3CA, PMS2, PMS2CL, PTEN, RAD51C, RAD51D, RAD50, STK11, TP53, XRCC2	>200X	Sangue Periférico

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

***Cristovam Scapulatempo Neto**
Gerente médico da Patologia Molecular da DASA.;
Doutorado em ciências pelo Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo (USP).

***Dra. Flora Finguerman**
Coordenadora dos serviços de diagnósticos em mama da DASA-SP;
Especialista em radiologia e diagnóstico por imagem pelo Colégio Brasileiro de Radiologia – CBR/AMB;
Doutora em diagnóstico por imagem pelo Departamento de Diagnóstico por Imagem – DDI – da Escola Paulista de Medicina – Unifesp.

Dra. Ilana Zalcberg Renault e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto*

TARGET ONE PAN CANCER™

A mais moderna solução de diagnóstico molecular para a determinação de alvos terapêuticos em tumores sólidos

COM O DESENVOLVIMENTO DA GENÔMICA, PRINCIPALMENTE POR MEIO DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS SEQUENCIADORES E DE SEQUENCIAMENTO DE RNA, milhares de alterações moleculares foram descobertas nos últimos anos. A descoberta das novas mutações, deleções, amplificações, inversões, translocações e fusões gênicas nos permitiu subclassificar tipos conhecidos de tumores, como, por exemplo, o adenocarcinoma pulmonar, em múltiplas doenças com características clínicas próprias. Assim, hoje, podemos falar que estamos frente a um novo desafio da oncologia moderna, pois estamos lidando com centenas de doenças raras que antigamente eram encaradas como uma única doença, e isso explica a heterogeneidade de resposta à quimioterapia que era observada nos pacientes com câncer de pulmão, por exemplo.

Cada alteração molecular tem uma frequência muito baixa, e, para que possamos dar a possibilidade de tratamento que cada ser humano merece, temos que testar muitos alvos em cada tumor, o que por vezes se torna impossível por dois motivos, custo e disponibilidade de tecido.

> O TARGET ONE PAN CANCER™ é uma solução diagnóstica que detecta mais de 500 alterações genéticas em 52 genes, com potencial terapêutico na maioria dos tumores sólidos. As variantes testadas na grande maioria são tratáveis com drogas já aprovadas pelo U.S. Food and Drug Administration, fazem parte dos guidelines da NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ou estão sendo validadas em múltiplos clinical trials

Testar vários alvos diferentes de maneira isolada é extremamente caro, pois as técnicas disponíveis no mercado para que façamos isso ainda têm custo elevado. Técnicas como o Fish e a imuno-histoquímica, utilizando anticorpos validados como *companion* ou *complementary diagnostics*, têm custos semelhante e ainda estão sujeitos à avaliação da interpretação do observador, muitas vezes gerando muitos resultados falso-negativos, principalmente com o Fish, o que impede o benefício da terapia-alvo para muitos pacientes. Siraj M. Ali e colaboradores publicaram na revista *The Oncologist*, em 2016, que, utilizando NGS, encontraram rearranjos em ALK em 41 dos 1.070 pacientes testados (4,4%) e destes 41 pacientes, 31 tinham feito Fish previamente para a pesquisa de rearranjos no gene ALK. Destes 31 pacientes, 20 foram ALK positivos pelo Fish e 11 foram negativos, ou seja 35% de resultados falso-negativos. Dos 11 casos negativos para o Fish, mas positivos por NGS, nove tomaram Crizotinib, tendo sete pacientes atingido resposta com média de duração de 17 meses[1].

Como dito previamente, não somente o custo é uma limitação para o uso de múltiplas plataformas para a detecção de alvos terapêuticos, um termo que na oncologia moderna gostamos muito de usar é que o TECIDO É PRECIOSO (*tissue is the issue*). Com o avanço da radiologia intervencionista, cada vez mais recebemos amostras muito pequenas que temos que manusear com cautela, pois precisamos, além de fazer um diagnóstico acurado, que muitas vezes necessita de estudo imuno-histoquímico, guardar tecido para a realização de testes moleculares.

Pensando em uma maneira inteligente de resolver todos esses problemas do dia a dia e entregar de forma rápida, segura e utilizando uma pequena quantidade de tecido, a DASA traz ao mercado nosso novo teste de medicina personalizada, o TARGET ONE PAN CANCER™.

O TARGET ONE PAN CANCER™ é uma solução diagnóstica que detecta mais de 500 alterações genéticas em 52 genes, com potencial terapêutico na maioria dos tumores sólidos. As variantes testadas na grande maioria são tratáveis com drogas já aprovadas pelo U.S. Food and Drug Administration, fazem parte dos guidelines da NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ou estão sendo validadas em múltiplos clinical trials. O teste avalia variantes únicas de nucleotídeos (SNVs), pequenas

Tabela 1. Genes e alterações pesquisadas no teste TARGET ONE PAN CANCER™

Mutações, deleções e inserções		Número de cópias	Fusões Drivers
35 genes		19 genes	23 genes
DNA			RNA
AKT1	JAK1	ALK	ABL1
ALK	JAK2	AR	ALK
AR	JAK3	BRAF	AKT3
BRAF	KIT	CCND1	AXL
CDK4	KRAS	CDK4	BRAF
CTNNB1	MAP2K1	CDK6	EGFR
DDR2	MAP2K2	EGFR	ERBB2
EGFR	MET	ERBB2	ERG
ERBB2	MTOR	FGFR1	ETV1
ERBB3	NRAS	FGFR2	ETV4
ERBB4	PDGFRA	FGFR3	ETV5
ESR1	PIK3CA	FGFR4	FGFR1
FGFR2	RAF1	KIT	FGFR2
FGFR3	RET	KRAS	FGFR3
GNA11	ROS1	MET	MET
GNAQ	SMO	MYC	NTRK1
HRAS		MYCN	NTRK2
IDH1		PDGFRA	NTRK3
IDH2		PIK3CA	PDGFRA
			PPARG
			RAF1
			RET
			ROS1

> O teste TARGET ONE PAN CANCER™ é o nosso nome comercial para o teste Oncomine Focus Assay, da Thermo Scientific. Esse teste é realizado nas plataformas Ion Torrent Personal Genomic Machine (PGM) e no Ion Proton, que são plataformas de NGS da Thermo Fisher que dispomos na DASA

Tabela 2. Dados da validação do teste Oncomine Focus Assay

	Sensibilidade	Especifidade	Reproducibilidade
Mutuações pontuais	98.77%	99.63%	99.6%
Inserções e deleções (indels)	100%	100%	100%
Variações no número de cópias CNVs	96.42%	100%	96.42%
Fusões Gênicas	100%	100%	100%
Geral	98.70%	99.67%	99.01%

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/oncomine-focus-assay-performance-white-paper.pdf

deleções, inserções, variação do número de cópias (CNVs) e fusões gênicas utilizando DNA e RNA em um único fluxo de trabalho.

Uma grande vantagem do teste TARGET ONE PAN CANCER™ é que são necessários somente 10 nanogramas de DNA e RNA para a realização do exame. Quantidade essa que é facilmente obtida em amostras pequenas provenientes de biópsias e até de punções aspirativas por agulha fina.

O teste TARGET ONE PAN CANCER™ é o nosso nome comercial para o teste Oncomine Focus Assay, da Thermo Scientific. Esse teste é realizado nas plataformas Ion Torrent Personal Genomic Machine (PGM) e no Ion Proton, que são plataformas de NGS da Thermo Fisher que dispomos na DASA. Como todo teste de NGS, o tempo para a realização do teste não é tão rápido como um exame de imuno-histoquímica ou PCR, que podem ser realizados no mesmo dia, o tempo de execução do exame é de cerca de cinco dias. Após todas as etapas do exame realizadas, os dados provenientes do sequenciamento são carregados na nuvem e analisados bioinformaticamente, buscando as variantes encontradas em um enorme banco de dados. A imensa quantidade de dados produzida durante o sequenciamento é comparada com os dados contidos em um dos maiores bancos de dados do mercado que se chama Oncomine Knowledge Database e o resultado dessa análise é reportada com o software Oncomine Knowledgebase repórter.

O resultado do teste é bastante fácil de ser entendido e mostra a importância biológica das variantes encontradas, reportando se confere sensibilidade ou resistência a vários fármacos. O laudo ainda traz informações acerca da disponibilidade de estudos clínicos abertos no Brasil e no mundo para a alteração molecular encontrada.

O poder da tecnologia utilizada no teste TARGET ONE PAN CANCER™ para a identificação de alterações genéticas foi validada e é a utilizada no trial do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos - The National Cancer Institute Molecular Analysis for Therapy Choice (NCI-MATCH). Nesse estudo, utilizando material parafinado, o teste exibiu sensibilidade de 96,98% e especificidade de 99,99% para a detecção de 265 mutações conhecidas. Também houve alta reprodutibilidade (99,99%) em detectar a mesma variante nos quatro laboratórios que participaram da validação. O limite para a detecção de cada tipo de variante foi de 2,8% para as variantes de único nucleotídeo (SNV), 10,5% para as inserções/deleções, 6,8% para as grandes inserções/deleções (>4 pares de base) e quatro cópias para a amplificação[2].

Além da validação internacional pelo NCI-MATCH, a tecnologia do Oncomine Focus Assay também foi avaliada e validada pela nossa equipe para o desenvolvimento do teste TARGET ONE PAN CANCER™. Nos nossos ensaios, foram analisadas amostras comerciais parafinadas e amostras de biópsia de pacientes previamente caracterizadas por outras metodologias. As amostras controle apresentavam SNVs e Indels em diferentes genes com frequência do alelo variante (VAF) de 5% e 50%, o que nos permitiu avaliar a sensibilidade e o limite de detecção do ensaio. Nosso ensaio foi capaz de detectar 100% das variantes previstas nos controles e foi sensível para a detecção de SNVs e Indels com VAF de até 5%, o que está de acordo com o descrito nos ensaios de valida-

Figura 1. Workflow do teste TARGET ONE PAN CANCER™

ção do Oncomine Foccus Assay[5]. Para a análise de variação de número de cópias, amostras positivas para a amplificação previamente verificadas por imuno-histoquímica foram analisadas, sendo o resultado por NGS também positivo para a amplificação. O ensaio foi capaz de detectar 100% das fusões gênicas em amostras sabidamente positivas. A reprodutibilidade e a estabilidade dos ensaios foram avaliadas pela análise de amostras em duplicata e pela reanálise dessas amostras em um ensaio independente. As variantes presentes nas amostras foram detectadas de forma consistente e com parâmetros semelhantes em ambos os casos, evidenciando que nossos ensaios foram 100% reprodutíveis.

Estamos muito contentes de poder oferecer aos nossos parceiros médicos essa ferramenta diagnóstica fantástica que alia tecnologia, confiança e alta acurácia, para que os seus pacientes tenham o benefício da cura ou ganho da sobrevida livre de doença ou sobrevida global, sempre com a melhor qualidade de vida possível. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dra. Ilana Zalcberg Renault**
Consultora em genética molecular da DASA;
Doutorado em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz;
Mestrado em imunologia pelo Instituto Karolinska.

***Cristovam Scapulatempo Neto**
Gerente médico da Patologia Molecular da DASA.;
Doutorado em ciências pelo Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo (USP).

Dr. José Eduardo Levi*

Biópsia líquida: O estado da arte e a atual aplicabilidade clínica

O emprego do ctDNA no diagnóstico dos pacientes com tumores sólidos

BIÓPISA LÍQUIDA É UM TERMO CADA VEZ MAIS UTILIZADO NA MEDICINA DIAGNÓSTICA. Conceitualmente, trata-se exatamente do que sugere o nome, a possibilidade de biopsiar um tumor sólido, no sentido de amostrá-lo, por meio do sangue, portanto, sem a necessidade de obtenção de um fragmento do tecido neoplásico. Porém, onde se encontra, na corrente sanguínea, essas fontes de material genético? E como investigá-las?

Sabemos que em um paciente com câncer, células tumorais circulantes (CTCs) podem ser encontradas no sangue, frequentemente em baixíssimas quantidades. A maior dificuldade reside em separar as CTCs dos milhões de leucócitos normais do paciente. Dispositivos que se valem de anticorpos contra moléculas de adesão, presentes apenas nas CTCs, se mostraram capazes de recuperar CTCs, recebendo recentemente a aprovação do FDA [1]. Uma vez isoladas, as CTCs são submetidas a métodos moleculares, que buscam identificar características do tumor primário, em geral mutações associadas à suscetibilidade ou resistência aos

> Na oncologia, o uso diagnóstico do cfDNA progrediu rápida e amplamente [11], apresentando, em alguns modelos, como no câncer de mama metastático, uma sensibilidade muito superior às CTCs [12]

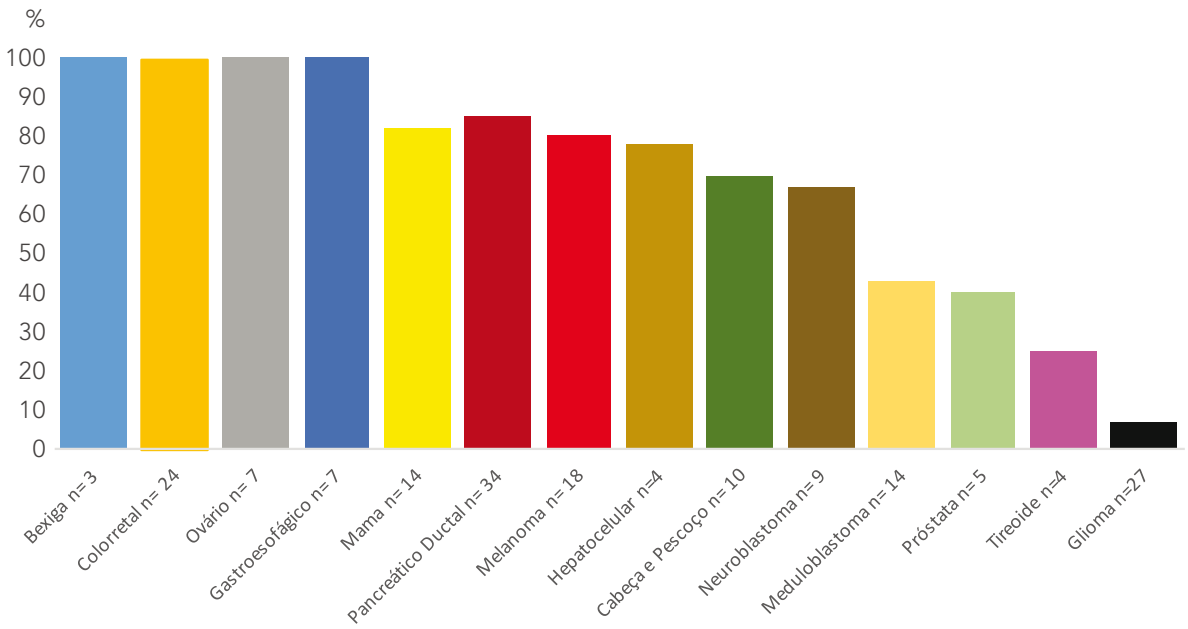


Figura 1. Percentual de ctDNA detectado em tumores de diferentes localizações anatômicas. (Adaptado de Bettegowda et al., ref 15).

novos agentes antineoplásicos, que atuam sobre mecanismos moleculares envolvidos na origem e na manutenção da transformação celular, a denominada terapia-alvo (*targeted therapy*). No entanto, a validação do uso clínico dessa informação das CTCs ainda está pendente.

Uma segunda fonte de informação genética, disponibilizada pela biópsia líquida, é o DNA livre circulante presente no plasma (*cell-free DNA = cfDNA*), cuja presença foi descrita pela primeira vez por Stroun & Anker, em diferentes organismos eucarióticos [2]. No entanto, a utilização desse cfDNA como analito para testes diagnósticos, só se popularizou a partir do avanço das tecnologias de amplificação, na década de 1990, culminando, recentemente, com seu uso rotineiro na medicina fetal, a qual permitiu a implantação do diagnóstico não invasivo de anomalias cromossômicas fetais [3], o reconhecimento precoce do sexo fetal [4] e a determinação do RhD fetal em grávidas RhD negativo [5].

No organismo saudável, a origem do cfDNA é predominantemente hematopoiética, provindo de células apoptóticas [6], embora em processos patológicos agudos, que geram necrose tecidual, esta se torna uma fonte importante, respondendo por

> Na detecção precoce, a presença de mutações sabidamente associadas a determinado tipo de tumor são pesquisadas no DNA plasmático

um elevado percentual do cfDNA plasmático, como verificados na pré-eclâmpsia [7], em doenças autoimunes [8], no infarto agudo do miocárdio [9] e até mesmo após intenso esforço físico [10].

Na oncologia, o uso diagnóstico do cfDNA progrediu rápida e amplamente [11], apresentando, em alguns modelos, como no câncer de mama metastático, uma sensibilidade muito superior às CTCs [12]. O cfDNA, aqui denominado ctDNA (*circulating-tumor DNA*), é de obtenção muito mais simples e barata que as CTCs, basta uma coleta de 5-10mLs de sangue periférico e separação do plasma, onde está contido o ctDNA. Ressalta-se que, se no sangue periférico serão encontradas 1-10 CTCs/mL, no cfDNA existe um efeito de concentração do ctDNA, também verificado no DNA fetal na gravidez, onde o ctDNA e o DNA fetal podem corresponder a 1% a 10% do total, portanto, uma proporção muito maior que a de CTCs x leucócitos do paciente. Embora esse percentual seja alto, a quantidade absoluta de cfDNA é pequena, apenas 1-10ng/uL. Consequentemente, qualquer análise de cfDNA baseia-se em métodos de amplificação molecular, dos mais simples, como a detecção da(s) mutação (ões) por PCR em tempo real, passando pelo chamado PCR digital até os métodos de sequenciamento de nova geração (NGS), que empregam mais de uma etapa de amplificação por PCR. A escolha do método de análise passa por um balanço entre a sensibilidade analítica e a amplitude da cobertura genômica desejadas. O NGS proporciona uma maior cobertura do genoma, porém, será capaz de detectar menores quantidades de ctDNA do que as técnicas de PCR em tempo real e digital, nos quais essas interrogam apenas uma ou algumas mutações pré-determinadas.

A necessária demonstração de que de fato o cfDNA em pacientes com câncer contém ctDNA representativo do tumor sólido foi obtida recentemente em alguns trabalhos que primeiramente verificaram as mutações presentes nos tumores primários e depois detectaram tais mutações no plasma [14,15]. O trabalho de Bettegowda e cols. [15] estudou diferentes tipos de tumores e estadios; em 82% dos casos metastáticos de tumores de ovário, bexiga, coloretal, gastroesofágicos, fígado e mama foi possível a identificação no plasma de mutações presentes no tecido tumoral, mostrando a ampla possibilidade de uso oncológico da biópsia líquida. No entanto, esse trabalho expõe duas limitações do método:

- Só é possível sua aplicação nos casos em que se conhece, *a priori*, o perfil mutacional do tumor individual;
- Alguns tumores não estão representados no ctDNA (Figura 1).

Uma característica importante do cfDNA é sua meia-vida curta. O ctDNA resulta de um processo dinâmico no qual céulas apoptóticas nos tecidos liberam pequenos fragmentos de DNA para a circulação, que se acumulam no plasma e são eliminados na urina [16]. Assim, o ctDNA, no caso do tumor, irá refletir a constituição genética presente das células tumorais em proliferação, o que é uma grande vantagem, uma vez que sabemos que as células tumorais se modificam no curso da doença, ganhando e perdendo mutações e alterações genéticas maiores. Dessa forma, a biópsia feita no momento do diagnóstico e o início do tratamento poderão não refletir o status molecular presente.

Em resumo, podemos dividir as aplicações oncológicas da biópisa líquida em três campos:

1. Detecção precoce;
2. Monitoramento do tratamento;
3. Escolha terapêutica e identificação de resistência.

Na detecção precoce, a presença de mutações sabidamente associadas a determinado tipo de tumor são pesquisadas no DNA plasmático. Quando encontradas, sinalizam a existência de um processo neoplásico. O estudo de Gormally *et al.* [16] pesquisou mutações de p53 e KRAS em um banco de amostras de plasma de indivíduos que, anos após desenvolveram câncer, revelou que a mutação no plasma estava presente anos antes do diagnóstico da neoplasia. No entanto, mutações em p53 são muito frequentes nas neoplasias humanas, portanto, a simples presença da mutação no ctDNA não permite a identificação do órgão acometido. Também não se sabe a especificidade desse diagnóstico, o que implica obviamente em uma questão ética e científica complexa.

Trabalhos que empregam o ctDNA no monitoramento do tratamento verificam que o ctDNA funciona como um marcador fidedigno de resposta, mas também sinaliza, precocemente, a recidiva tumoral. No estudo de Forshew e cols. [13], verifica-se um paralelo preciso entre o níveis de ctDNA e CA 125, um biomarcador tradicional do câncer de ovário na evolução de um grupo de pacientes, o mesmo tendo sido encontrado no câncer de mama metastático quando comparado o ctDNA com o CA 15-3, um biomarcador dessa neoplasia [14].

Já o uso do ctDNA na escolha do tratamento e na identificação de mutações, que os tornem ineficazes, está se tornando uma realidade em 2016, nos centros oncológicos mais avançados. O câncer de pulmão de céulas não pequenas (NSLCC), talvez seja o tipo de tumor em que o emprego do ctDNA no manejo clínico esteja mais avançado. Os especialistas já consideram válido um diagnóstico de mutação de KRAS ou EGFR feito dessa forma não invasiva, dado o valor preditivo positivo altíssimo do método, evitando a necessidade de rebiópsias [19].

Em conclusão, o emprego do ctDNA (biópsia líquida) deverá ser utilizado cada vez mais no diagnóstico e no manejo dos pacientes com tumores sólidos, permitindo o acesso direto e atualizado da genética tumoral, guiando as terapias-alvo e proporcionando aos pacientes melhores respostas e menor custo e risco associado aos procedimentos invasivos. ■

REFERÊNCIAS

www.dasa.com.br/referencias

***Dr. José Eduardo Levi**
Consultor especialista em biologia molecular na DASA;
Doutor em microbiologia pela USP – Universidade de São Paulo.

Grupo

DASA

GENEONE
Medicina de precisão.

Grupo
DASA