

IMPORTÂNCIA DA GENÉTICA MOLECULAR EM ONCOLOGIA*

LEONOR PARREIRA

Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina de Lisboa.

RESUMO

O desenvolvimento da Genética Molecular, nas últimas três décadas, teve um importante impacto em todas as áreas da investigação médica, repercutindo-se de forma particularmente significativa na investigação oncológica. Um conjunto de novas metodologias, especialmente concebidas para analisar a estrutura e expressão de genes celulares, cedo ultrapassou a fronteira da investigação fundamental para ter uma aplicação cada vez mais directa e quotidiana em problemas clínicos concretos. A uma compreensão mais profunda da biologia da célula neoplásica seguiram-se novos instrumentos de diagnóstico e novas modalidades terapêuticas. A revisão do que tem sido a contribuição da Genética Molecular na investigação, diagnóstico e terapêutica em oncologia, é o objectivo deste trabalho.

SUMMARY

Molecular genetics in oncology

The development of Molecular Biology in recent years has had a profound impact in all Medical research fields and has been particularly important for the progress of oncology research. A whole body of new methodologies has been specifically designed to investigate the structure and the expression of cellular genes. This new field has rapidly extended far beyond basic research, with applications that are becoming exceedingly relevant in the resolution of many important clinical problems. As a consequence of a better understanding of the biology of neoplastic cells, more rational therapeutic approaches as well as new diagnostic tools could be developed. The objective of the present work is to discuss the multiple contributions of Molecular Biology in research, diagnosis and therapy in oncology.

INTRODUÇÃO

O cancro é uma doença multifactorial, pleiotrópica nas suas manifestações, sendo o processo de malignização celular um fenómeno de extrema complexidade. Um tumor maligno clinicamente detectável, não é mais do que a expressão extrema da profunda desregulação de um ecossistema celular, em que mecanismos tão básicos e essenciais como o controlo de proliferação, crescimento e respeito territorial se encontram irreversivelmente perturbados. No entanto, independentemente da variabilidade na expressão fenotípica de uma célula tumoral, o cancro pode ser considerado como uma doença genética de células somáticas⁵. A confirmação experimental deste conceito deve-se integralmente à introdução das novas metodologias da Genética Molecular, em particular da tecnologia de DNA-recombinante, a partir do início da década de 70²³. As novas técnicas trouxeram consigo a possibilidade de clonar e sequenciar genes, de estudar a sua expressão *in vitro* e *in vivo*, de os introduzir em linhas celulares ou mesmo em células germinais de animais, de deduzir facilmente os produtos que codificam e obter as respectivas proteínas em quantidades virtualmente ilimitadas. O poder desta versatilidade tecnológica não se esgotou no entanto na investigação fundamental da oncogénese. A aplicação astuta das mesmas ferramentas instrumentais no campo do diagnóstico, teve já profundas implicações na Oncologia Clínica e é previsível que num futuro não muito distante a Genética Molecular possa modificar radicalmente as estratégias terapêuticas de que dispomos actualmente.

1. A GENÉTICA MOLECULAR NA INVESTIGAÇÃO DO CANCRO

Teoria Molecular da Oncogénese⁵

A suspeita de que alterações no material genético de uma célula poderiam estar na base da transformação maligna foi pela primeira vez formulada, no início do século, por Theodor Boveri¹. Boveri baseou a sua teoria no facto de células cancerosas evidenciarem, com frequência, alterações da cromatina e figuras mitóticas anormais. Observações de outro tipo, acumuladas no decorrer dos anos, convergiam para a mesma conclusão, nomeadamente a constatação de que agentes químicos e físicos genotóxicos podem induzir cancro, e ainda o conhecimento de que certas formas de neoplasia têm transmissão hereditária. No entanto, foi a análise experimental de retrovírus oncogénicos, a partir de 1970^{2,3}, que revelou pela primeira vez a existência de genes capazes de induzir a transformação maligna. Estes achados foram paralelamente corroborados por experiências em que genes, isolados a partir de DNA tumoral, eram transfectedos em linhas celulares (entendendo-se por transfecção a introdução de DNA numa célula), induzindo nestas a transformação maligna⁴.

1.1 *Retrovírus, oncogenes e proto-oncogenes*^{2,3,5}

Os retrovírus são pequenos vírus de RNA, que devem o seu nome ao facto de produzirem transcriptase reversa (TR), um enzima capaz de polimerizar moléculas de DNA a partir de um molde de RNA². A TR é um enzima fundamental para o ciclo de vida do vírus. Um retrovírus, ao infectar uma célula, introduz nela o seu genoma de RNA, o qual é copiado para DNA por acção da TR. O DNA viral integra-

* O trabalho experimental integrado neste artigo foi subsidiado pela JNICT (Projecto n.º 87576)

se posteriormente no genoma da célula hospedeira, onde constitui um provírus, passando a usufruir da maquinaria de transcrição da célula infectada. Os genes virais são transcritos para RNA o qual irá, por um lado, originar novos genomas virais e, por outro, codificar a síntese das proteínas da cápside e do envólucro do vírus. Da assembleia destes componentes resulta a formação de uma nova partícula viral passível de infectar uma outra célula. Alguns retrovírus são oncogénicos em diversas espécies animais e de entre eles um sub-grupo, caracteriza-se pela sua capacidade de induzir neoplasias no animal hospedeiro, após um curto período de incubação. A sequenciação do genoma dos retrovírus de acção rápida, conduziu à identificação de sequências capazes de transformar determinados tipos celulares *in vivo*, bem como de transformar *in vitro* linhas celulares imortalizadas. Estas sequências foram designadas v-oncs. Experiências de hibridação de v-oncs com DNA normal de várias espécies animais, demonstraram a existência de sequências semelhantes às dos oncogenes virais em células normais³. Estas sequências de DNA celular, denominadas c-oncs ou proto-oncogenes, em função dessa homologia, apresentam uma estrutura molecular notavelmente conservada em espécies filogeneticamente distantes, facto que sugeriu de imediato que desempenhassem um papel fundamental em funções básicas da célula normal. Na verdade, os v-oncs não são mais que versões modificadas de genes celulares, capturados

pelo vírus no decurso de sucessivos ciclos de replicação. Mais de 20 oncogenes foram identificados até ao momento, cada um correspondendo a um determinado c-onc nas células normais de verterbados. Destes, pelo menos 12 foram até à data implicados na génese de neoplasias humanas. Os produtos codificados pelos proto-oncogenes celulares têm sido alvo de intensa investigação nos últimos anos, bem como os mecanismos que presidem à sua conversão em verdadeiros oncogenes. A localização sub-celular das respectivas proteínas é conhecida para muitos deles, verificando-se que são transcritos em diversos tecidos, por vezes em quantidades vestigiais. A sua associação com a membrana celular, citoesqueleto ou com o próprio DNA, sugere que estejam envolvidos em múltiplos processos bioquímicos da célula.

1.2 As proteínas codificadas por proto-oncogenes celulares intervêm nos mecanismos de crescimento e proliferação celular⁵

Do ponto de vista funcional, as proteínas codificadas por proto-oncogenes celulares podem distribuir-se por cinco classes (Quadro 1):

1. Factores de crescimento celular

São dois os exemplos conhecidos representativos desta classe. Um é o factor de crescimento derivado das plaquetas,

QUADRO 1 — Oncogenes, origem e funções^{3,5}

Oncogene Família	Retrovírus	Função celular do proto-oncogene correspondente
Factores de crescimento		
v-sis KS3* hst* int 2	Sarcoma do macaco — (síndrome de Kaposi) — (carcinoma humano) —	Fact. cresc. der. plaquetas Fact. cresc. fibroblastos Idem Idem
Tirosina-cinases (proteínas membranares)		
v-fms v-erb B v-kit neu* met*	sarcoma felino (Susan McDonough) Eritroblastose, aves sarcoma felino (HZ4) —(neuroblastoma, rato) —(osteosarcoma humano)	Receptor do CSF-1 (a) Recep. factor cres. epitelial ? ? ?
Tirosina-cinases (proteínas associadas à membrana)		
v-src v-yes v-abl v-fes v-fps	sarcoma, galinha (Rous) sarcoma, galinha (Yamaguchi-79) leucemia, murganho (Abelson) sarcoma, gato (Snyder-Theilen) sarcoma, galinha (Fujinami)	? ? ? ? ?
Ligação a GTP e GTPases		
Família ras v-H-ras v-K-ras N-ras*	eritroleuc., rato (harvey) sarcoma rato (kirsten) —	Ligação a GTP e GTPases Idem Idem
Família de proteínas nucleares		
v-myc N-myc** L-myc** v-myb v-fos v-ski	Mielocitomatose, galinha — (neuroblastoma humano) — (car. pulmão, humano) Mieloblastose, aves Sarcoma, murganho Sarcoma, aves (Sloan Kettering)	Ligação ao DNA ? ? Ligação ao DNA Ligação ao DNA ?

* Oncogene detectado por transfecção de DNA tumoral. Sem contrapartida conhecida em genomas de retrovírus.

** Oncogene amplificado em neoplasias (ver texto). Sem contrapartida conhecida em genomas de retrovírus.

(a) Factor estimulante de colónias hematopoiéticas

? Actividade específica desconhecida

codificado por *c-sis*, um gene celular estruturalmente homólogo ao oncogene do retrovírus do sarcoma do macaco (*v-sis*). O outro é um factor de crescimento de fibroblastos, codificado pelo gene *hst* (human stomach carcinoma). Ao contrário do anterior, este gene não tem contrapartida conhecida em nenhum retrovírus, tendo sido identificado em experiências de transfecção de DNA tumoral humano em linhas celulares imortalizadas.

2. Receptores para factores de crescimento

Representados pelos produtos dos genes *c-erb B* (homólogo de *v-erb B* do vírus de eritroblastose nas aves) que codifica o receptor para o factor de crescimento epitelial e do gene *c-fms* (homólogo do *v-fms* do vírus de um sarcoma do gato) que codifica o receptor de um factor de crescimento hematopoético (CSF-1). Ambas as proteínas se localizam na membrana celular e possuem adicionalmente actividade fosforiladora de resíduos de tirosina.

3. Enzimas fosforiladores de tirosina (tirosina-cinases)

Esta classe, na qual se inclui o maior número de *v-oncs* e *c-oncs* (Quadro 1) pode ser subdividida em 2 famílias: uma, constituída por proteínas transmembranares, que inclui os receptores de factores de crescimento da classe anterior, outra constituída por proteínas associadas à membrana mas não transmembranares. Vários genes desta classe parecem estar envolvidos na carcinogénese humana, e têm como denominador comum o facto de os seus produtos serem enzimas que fosforilam o aminoácido tirosina. A fosforilação de tirosina é um fenómeno que pode intervir na regulação da forma e crescimento celular. A expressão dos genes desta família parece ter uma distribuição tecidual específica. Por exemplo, o produto de *c-src* (homólogo de *v-src* do sarcoma de Rous) é uma tirosina-cinase que tem como alvo proteínas do citoesqueleto em determinados tipos celulares (plaquetas e algumas células neuronais), admitindo-se que esteja envolvido na transdução de sinais bioquímicos provenientes da ligação de um ligando ao respectivo receptor.

4. Proteínas de ligação a GTP e GTPásicas

Esta classe engloba os proto-oncogenes do grupo *ras* (homólogos de *v-ras* do retrovírus de um sarcoma do rato). As proteínas *ras* localizam-se na membrana celular e estão envolvidas na génese de segundos mensageiros químicos resultantes da activação da célula por estímulos mitogénicos.

5. Proteínas de ligação ao DNA

As proteínas codificadas por genes desta classe, localizam-se no núcleo onde se ligam ao DNA, estando muito provavelmente envolvidas, de uma forma directa, na regulação de genes que controlam os mecanismos de divisão e diferenciação celular. Por exemplo, a transcrição dos genes *myb* e *myc* diminui drasticamente durante a diferenciação terminal da célula, e a sua expressão ocorre em momentos específicos do ciclo celular.

O conhecimento do papel funcional das proteínas codificadas por proto-oncogenes veio portanto confirmar aquilo que a sua conservação filogenética já sugeria: que desempenham funções básicas e primordiais na regulação do crescimento, proliferação e da própria integridade estrutural da célula.

1.3 Diversos mecanismos podem converter um proto-oncogene celular num verdadeiro oncogene⁵

Na sua forma nativa, um proto-oncogene é incapaz de induzir a transformação maligna. Para que tal aconteça é necessário que surjam perturbações quantitativas ou qualitativas na sua expressão. Uma vez que as proteínas codificadas por estes genes são funcional e estruturalmente heterogêneas, não é surpreendente que a sua desregulação dependa de mecanismos moleculares igualmente heterogêneos.

Conhecem-se actualmente 4 mecanismos de activação de proto-oncogenes dos quais, pelo menos 3, já foram demonstrados em patologia humana:

1. *Mutação por inserção*. Este mecanismo consiste no aumento da actividade transcricional de um proto-oncogene resultante da inserção de um retrovírus na sua vizinhança. É um fenómeno conhecido em neoplasias hematopoiéticas de aves. Não foi no entanto ainda demonstrado em neoplasias humanas. A desregulação do gene normal da célula resulta da influência de sequências reguladoras de transcrição, existentes nas extremidades do genoma viral.

2. *Amplificação*. Este fenómeno corresponde ao aumento de cópias no genoma de um proto-oncogene. A amplificação de um oncogene, que pode ser detectada citogeneticamente (através do aparecimento de cromossomas anormais com regiões de coloração homogênea ou de corpúsculos de cromatina sem centrómero), conduz a um aumento significativo da sua expressão. São exemplos deste fenómeno, a amplificação do *n-myc* em neuroblastomas, do *Ki-ras* em carcinomas do cólon ou do *c-abl* em leucemia mielóide crónica.

3. *Translocações cromossómicas*. Rearranjos cromossómicos, envolvendo pontos de factura coincidentes com *loci* de proto-oncogenes, constituem um terceiro mecanismo de activação, particularmente frequente em neoplasias humanas⁶. Exemplos bem documentados do ponto de vista molecular, são as translocações do linfoma de Burkitt, o cromossoma Filadélfia (Ph) na leucemia mielóide crónica e a t(14;18) nos linfomas foliculares. Nas translocações do linfoma de Burkitt o proto-oncogene *c-myc*, localizado no cromossoma 8, fica em contacto com os genes de cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas, localizados nos cromossomas 2 e 8 (cadeias leves kapa e lambda, respectivamente) e 14 (cadeias pesadas). Como consequência da translocação, *c-myc* fica sob a influência das potentes regiões reguladoras de transcrição daqueles genes, admitindo-se que tal facto conduza à desregulação da expressão do proto-oncogene^{7,8}. O cromossoma Ph, presente em 90% dos doentes com leucemia mielóide crónica, consiste numa translocação entre os cromossomas 9 e 22. Neste rearranjo, parte do proto-oncogene *c-abl* (tirosina-cinase), localizado no cromossoma 9, desloca-se para o cromossoma 22, onde irá fundir-se com o gene *bcr* (tirosina-cinase). O gene quimérico resultante da translocação apresenta uma actividade enzimática marcadamente superior à dos genes normais que o originaram, o que poderá ser relevante na transformação maligna da célula pluri-potencial hematopoiética^{9,10}. A t(14;18), presente em 80% dos doentes com linfomas B foliculares, justapõe o gene *bc12* aos genes de cadeias pesadas de imunoglobulina⁸. A proteína codificada pelo *bc12*, foi recentemente caracterizada, admitindo-se que esteja envolvida nos mecanismos de morte celular programada (apoptose) de linfócitos B maduros recirculantes, precisamente as células normais homólogas do linfócito maligno no linfoma folicular¹¹.

4. *Mutação pontual*. Consiste na modificação de um ou mais nucleótidos na sequência do proto-oncogene. Este fenómeno parece ser particularmente importante na activação dos proto-oncogenes da família *ras*. Proteínas *ras* mutadas nos resíduos 12 e 61, e funcionalmente anormais, foram detectadas em múltiplas neoplasias humanas (um em cada quatro tumores humanos tem mutações num gene *ras*). Levando em conta o papel funcional que as proteínas *ras* desempenham na célula normal, é lícito admitir que a mutação possa traduzir-se em graves perturbações na transmissão de estímulos mitogénicos.

1.4 A carcinogénese é um fenómeno lento que evolui em múltiplos passos sequenciais^{12,13,14,15}

A oncogénese é um fenómeno lento que parece resultar da convergência de múltiplos e raros eventos moleculares. De

facto, experiências de transfecção de oncogenes em células ou em animais sugerem que um acidente molecular isolado não é suficiente para transformar uma célula de forma irreversível. Por exemplo, células mielóides normais só se transformam em células leucémicas após sucessivas transfecções, primeiro com *c-myc* activado e depois com *v-src*. Linfócitos B humanos normais, se tiverem sido previamente imortalizados pelo vírus de Epstein-Barr, são capazes de induzir tumores em ratinhos atímicos após transfecção com *c-myc* ou *c-ras* activados. Estudos em animais transgênicos apontam no mesmo sentido. Ratinhos em cuja células germinais foi introduzido um só oncogene activado (*c-myc* ou *c-ras*), não desenvolvem em geral neoplasias. Se a experiência for feita com os dois oncogenes activados, observa-se crescimento anormal em algumas células, as quais, após algum tempo, podem originar tumores malignos. No entanto, a maioria das células que expressam os transgenes não sofrem transformação malignas. A história natural de várias neoplasias humanas sugere igualmente a existência de fases evolutivas sequenciais (síndromas mielodisplásicos evoluindo para leucemia aguda, ou polipos que originam carcinomas, por exemplo). Estes estádios de transição acompanham-se caracteristicamente de modificações no fenótipo global da célula, as quais reflectem necessariamente múltiplas perturbações genéticas, muitas vezes traduzidas em alterações citogenéticas progressivamente mais complexas. Um fenómeno deste tipo está bem ilustrado na evolução clínica da leucemia mieloide crónica, na qual, a uma fase crónica de duração variável (em média 2 a 3 anos), se segue a transformação em leucemia aguda, com emergência de blastos imaturos provenientes de qualquer das linhagens hematopoiéticas. Do ponto de vista citogenético, a fase crónica caracteriza-se pela presença exclusiva, nas células malignas, de um cromossoma Ph. Com a aproximação da fase blástica, observa-se o aparecimento de um número progressivamente maior de outras alterações citogenéticas, algumas das quais parecem relacionar-se especificamente com o fenótipo da linha celular envolvida na transformação (Fig. 1)¹⁶.

1.5 Genes onco-supressores na carcinogénese^{17,18,20,22}

No seu conjunto, os proto-oncogenes celulares integram-se funcionalmente numa rede complexa, reguladora do cresci-

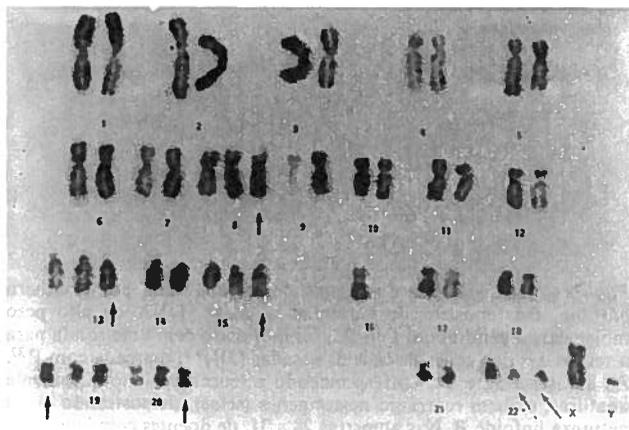


Fig. 1 — Cariotipo de medula óssea num doente com crise blástica de leucemia mieloide crónica (Bandas G). Observam-se duplicação do cromossoma Ph, trisomias 8, 13, 15, 19 e 20. Estas alterações ilustram a evolução clonal característica desta doença¹⁶.

mento e proliferação celular. Esta rede pode ser perturbada, como vimos, de diferentes formas e a diferentes níveis. Há no entanto boas razões para admitir que a activação de proto-oncogenes, um fenómeno que parece ocorrer apenas em células somáticas, é apenas um dos componentes do processo oncogénico. Recentemente foi identificado um outro grupo de genes cujos produtos se comportam como reguladores negativos do crescimento e proliferação celular. Por esta razão foram designados genes onco-supressores ou anti-oncogenes. Versões defeituosas destes genes podem ser transmitidas de geração em geração, através das células germinais. A existência de genes supressores de proliferação era desde há algum tempo admitida com base em dados experimentais e em observações clínicas. Experiências de hibridação de células somáticas normais com células tumorais, faziam reverter o fenótipo maligno a um fenótipo normal o mesmo acontecendo à linha celular maligna HL60 quando microinjectada com um cromossoma 11 humano normal. Do ponto de vista clínico, o estudo da biologia de uma neoplasia da criança, o retinoblastoma, apontava para a mesma conclusão¹⁸. O retinoblastoma é uma neoplasia rara, com uma incidência de 1 caso por cada 20 000 crianças, e manifesta-se clinicamente durante os primeiros 5 anos de vida. Surge sob duas formas: uma familiar, em que um dos progenitores tem a mesma doença, e outra esporádica, mais rara, na qual não existe história familiar de retinoblastoma. A forma bilateral atinge as duas retinas onde são observáveis múltiplos focos tumorais. Na forma esporádica, pelo contrário, a doença atinge tipicamente apenas uma das retinas e é unifocal. A análise citogenética de células de retinoblastoma revelava a presença de uma deleção intersticial no cromossoma 13 (q14). Na forma familiar a deleção estava igualmente presente em células normais do indivíduo, enquanto que na forma esporádica parecia restringir-se às células tumorais.

Em 1971, Alfred Knudson delineou a primeira teoria unificadora das duas formas de doença. Propôs que ambas dependessem de um mecanismo genético comum que envolveria duas mutações consecutivas. Na forma esporádica, seriam necessárias duas deleções intersticiais em ambos os cromossomas 13 numa só célula retiniana. Um fenómeno deste tipo, necessariamente coincidental e por isso mesmo raro, explicaria a natureza unifocal e unilateral da doença. Na forma familiar, uma das mutações estaria já presente na linha germinal do doente (traduzida pela deleção intersticial do cromossoma 13 em todas as células somáticas) pelo que uma segunda mutação no alelo normal do cromossoma par, explicaria a bilateralidade e o carácter multifocal do tumor. Em ambos os casos para que a mutação se perpetue num clone celular, terá que ocorrer em células retinianas ainda com potencialidade de proliferação e diferenciação. As células retinianas mantêm estas capacidades durante os primeiros 5 anos de vida, o que está de acordo com a idade de aparecimento do tumor. Sabe-se actualmente que o gene envolvido na génese do retinoblastoma (gene Rb), está bialelicamente deletado ou mutado, mesmo quando as células tumorais parecem citogeneticamente normais. O gene Rb codifica uma fosfoproteína de 105 KD que se liga ao DNA da célula, onde pode regular a transcrição de outros genes celulares^{19,21}. Foi igualmente demonstrado que a proteína Rb se liga, *in vitro*, a oncoproteínas nucleares codificadas por vírus de DNA oncogénicos e que, as suas características estruturais fazem supor que possa ligar-se *in vivo* a produtos codificados por proto-oncogenes celulares de localização nuclear (*myc* por ex.)^{19,20,22}. É possível que desta interacção dependa um equilíbrio dinâmico entre proteínas activadoras e supressoras de proliferação celular. Assim sendo, a ruptura na homeostase do crescimento e proliferação celular pode depender quer da activação de proto-oncogenes quer da inactivação de genes onco-supressores.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DO CANCRO²³

2.1 Citogenética Molecular

A identificação e clonagem dos genes envolvidos nos rearranjos cromossômicos característicos de diversas neoplasias, permitiu que a respetiva estrutura nucleotídica fosse caracterizada por técnicas de sequenciação. Foi a comparação das sequências dos genes alterados com as dos genes normais homólogos que permitiu definir, com rigor, o tipo de lesão genética em causa e deduzir, em muitos casos, a constituição em aminoácidos das respectivas proteínas. O conhecimento da sequência de um gene ou do mRNA por ele codificado, pode ser utilizado na construção de sondas moleculares específicas das regiões envolvidas em translocações cromossômicas ou qualquer outro tipo de alteração genética. Graças à enorme especificidade da ligação (ou hibridação), de bases complementares dos ácidos nucleicos, uma sonda genética irá detectar com grande precisão a sua sequência complementar em qualquer amostra de DNA, independentemente da sua proveniência²³. A aplicação deste princípio tem viabilizado a detecção de lesões moleculares específicas de tumor, em diversas neoplasias humanas. A técnica de eleição foi durante anos a de transferência-hibridação de Southern²⁴. A técnica de Southern tem no entanto inconvenientes que limitam a sua aplicação em vários contextos clínicos: uma morosidade nem sempre compatível com a urgência do diagnóstico oncológico, a necessidade de manipular quantidades significativas de DNA e um limiar de sensibilidade que impossibilita a identificação de uma população celular maligna minoritária (inferior a 5% da celularidade total). Em 1985, Saiki e colaboradores descrevem uma técnica que cedo se revelou de enorme interesse no diagnóstico de doenças que envolvam lesões genéticas (revisto em 25). A técnica permite a amplificação *in vitro* de qualquer fragmento de DNA, bastando apenas que parte da sua sequência seja já conhecida. É uma técnica de execução simples, actualmente totalmente automatizada, e baseia-se na repetição cíclica de 3 reacções: 1. desnaturação pelo calor do DNA; 2. Hibridação, a temperatura reduzida, com oligonucleótidos sintéticos complementares de pequenas regiões da sequência a amplificar, que funcionarão como iniciadores de polimerização para uma DNA-polimerase; 3. Polimerização de novas cadeias de DNA por acção de uma polimerase termo-estável (derivada do *Thermus aquaticus* ou Taq polimerase). Terminado cada ciclo de 3 reacções, uma nova cadeia de DNA foi sintetizada a partir de cada cadeia mãe. Todas as cadeias recém-sintetizadas vão por sua vez servir de molde para a síntese de novas cadeias, em ciclos subsequentes. O resultado é a amplificação exponencial da sequência alvo, inicialmente limitada, nas suas extremidades, pelos iniciadores. Trata-se portanto de uma reacção em cadeia que, em poucas horas, é capaz de amplificar mais de um milhão de vezes uma sequência específica de DNA. Por esta razão e pela sua extrema especificidade, este método tem sido de grande utilidade não apenas na investigação biológica mas também no diagnóstico de doenças que envolvam anomalias genéticas conhecidas. A detecção a nível molecular das alterações cromossômicas específicas de tumor anteriormente mencionadas é hoje possível, em tempo clinicamente útil, e pela primeira vez dispõe-se de um método suficientemente sensível para permitir a monitorização de doença residual em doentes em remissão clínica aparente²⁵.

2.2 Genes de receptores para antígeno no diagnóstico e classificação de neoplasias linfóides²⁶

A análise dos genes de imunoglobulina (Ig) e do receptor para antígeno de linfócitos T (RCT) em neoplasias linfóides,

alterou significativamente os conceitos sobre a patogénese destas doenças²⁷ ao mesmo tempo que contribuiu para o refinamento de sistemas classificativos com utilidade clínica. Apesar do número cada vez maior de anticorpos monoclonais reactivos com antígenos de diferenciação linfocitária, um número significativo de neoplasias não pode ser classificada com base numa análise estritamente fenotípica. A especificidade de muitos daqueles reagentes não só não é absoluta como, frequentemente, a célula maligna, por demasiado imatura, não expressa ainda Ig ou RCT, marcadores verdadeiramente essenciais de linhagem. Um problema adicional prende-se com a determinação de monoclonalidade em neoplasias B imaturas (ainda não expressando cadeias leves de Ig) ou em qualquer proliferação linfocitária T, uma vez que não existem, marcadores fenotípicos de monoclonalidade em células T. O esclarecimento da biologia molecular dos genes de Ig e do RCT veio resolver em grande parte estes problemas. Estes genes organizam-se, em células não linfóides, em segmentos descontínuos de DNA, transcritionalmente inactivos^{28,29}. Durante a diferenciação linfóide, os genes de Ig, na linhagem B, e do RCT na linhagem T, sofrem modificações estruturais que podem ser analisadas no DNA de células leucémicas por técnica de Southern. O rearranjo é um fenómeno precoce (precedendo o aparecimento dos respectivos receptores), irreversível, e único para cada célula (e como tal transmitido a toda a sua progenia). Constitui assim um marcador molecular específico de linhagem, particularmente útil do esclarecimento da origem celular de neoplasias imaturas ou indiferenciadas (Fig. 2a), bem como um marcador passível de identificar uma expansão clonal de linfócitos B ou T (Fig. 2b).

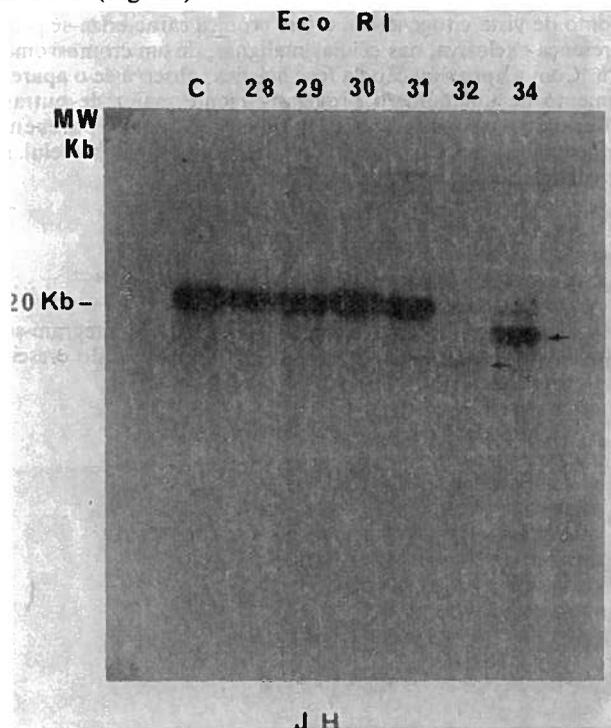


Fig. 2a—Configuração dos genes de Ig, analisada por Southern blotting, em amostras de leucemias agudas*. DNA de alto peso molecular, digerido com Eco RI, foi hibridado com uma sonda para a região J²⁸ dos genes de cadeias pesadas (JH)**, marcada com P³². As amostras 32 e 34, correspondendo a leucemias fenotipicamente imaturas, exibem rearranjo nestes genes (setas), demonstrando a sua natureza linfóide B. Nas amostras 28 a 31, de doentes com leucemias mieloblásticas os genes de Ig estão em configuração germinal.

* Laboratório de Biologia Molecular da FML — Instituto de Histologia e Embriologia.

** sondas cedidas por T. Rabbits^{36,37}.

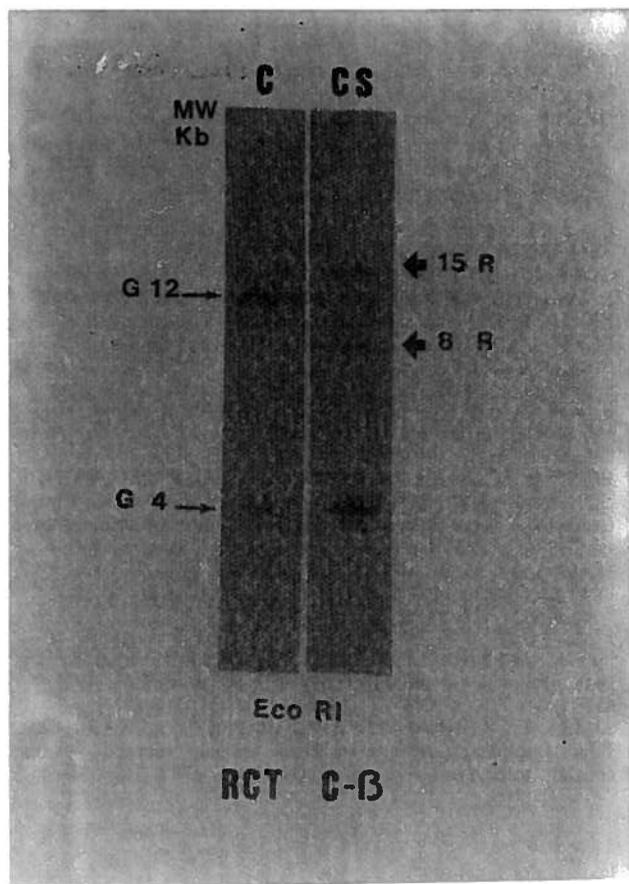


Fig. 2b—DNA de uma proliferação linfóide T crónica (CD4+, CD25+), hibridado com uma sonda para o gene β do RCT (C β)**. A presença de 2 bandas, compatível com um rearranjo bialélico no gene β , confirma a origem T da população celular, demonstrando adicionalmente a natureza da doença.

3. GENÉTICA MOLECULAR NA TERAPÊUTICA ONCOLÓGICA³⁰

Muitas das modalidades terapêuticas actualmente disponíveis em Oncologia, baseiam-se na utilização de fármacos citoredutores os quais, de uma forma geral, ou interferem com vias enzimáticas essenciais para a célula, ou interagem com o DNA, impedindo a sua replicação, ou impedem a formação de um fuso mitótico normal. O problema maior destas drogas é a sua falta de especificidade para o tecido neoplásico, sendo a destruição de células normais o factor limitativo mais importante na sua utilização. A transplantação da medula óssea, ao viabilizar a administração de doses letais de radio ou quimioterapia, ultrapassou em grande parte esta limitação, o que se traduziu numa melhoria significativa do prognóstico de várias neoplasias humanas. No entanto, se o cancro é causado pela lesão ou expressão aberrante de genes celulares, uma terapêutica oncológica verdadeiramente específica, será aquela que permita corrigir ou normalizar o defeito genético. Uma aproximação deste tipo é potencialmente aplicável em neoplasias cujo defeito predominante corresponda à perda ou inactivação de genes onco-suppressores. Experiências recentes apontam neste sentido: a introdução de um gene Rb normal, veiculado num retrovírus, em células de osteosarcoma, permitiu a reversão das

células malignas a um fenótipo normal³¹ e células de retinoblastoma transfectadas como o gene Rb normal perderam a oncogenicidade depois de transplantadas em ratinhos atímicos. A inactivação de proto-oncogenes desregulados é provavelmente mais difícil, exigindo o aperfeiçoamento de técnicas de mutagenese dirigida. Outro tipo de métodos, potencialmente úteis, consiste na introdução de genes de toxinas cuja expressão promova a destruição selectiva de determinados tipos celulares ou ainda de genes que induzam sensibilidade a drogas citoreductoras³². Alternativamente, a expressão de genes anormais pode ser bloqueada pela administração de oligonucleótidos *anti-sense*, isto é, com sequências complementares de mRNA específicos desses genes³³. É no entanto importante salientar que a aplicação de qualquer destas estratégias *in vivo* levanta ainda problemas consideráveis. Por um lado, a introdução de genes em qualquer célula é, em si mesma, um mecanismo de mutação de consequências difíceis de prever, e a inactivação de genes pode interferir com complexos mecanismos de regulação transcricional de outros genes. Por outro lado, a especificidade tecidual da manipulação genética é aqui também um problema não negligenciável. Neste contexto, a utilização de lipossomas especificamente dirigidos a um tecido alvo veiculando genes ou oligonucleótidos, ou de vírus citopáticos para determinados tecidos (que transfectem o gene de interesse) poderá no futuro ter importantes aplicações terapêuticas.

A contribuição da Genética Molecular na terapêutica oncológica pode no entanto considerar-se já significativa, em particular no que diz respeito à disponibilidade de proteínas sintetizadas por técnicas de DNA-recombinante, valiosas quer no tratamento de suporte do tratamento oncológico quer no tratamento específico de algumas neoplasias. São exemplos os vários factores de crescimento hematopoiéticos, de síntese recombinante, potencialmente utilizáveis na recuperação de aplasias iatrogénicas³⁴ e modificadores da resposta biológica, entre os quais os interferões recombinantes e a interleucina 2, cuja actividade anti-neoplásica é bem conhecida nalgumas neoplasias humanas³⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. BOVERI T.: The Origins of Malignant Tumors. London: Baillière, Tindall & Cox, 1929.
2. VARMUS H.: Retroviruses. Science, 1988; 240: 1427-1435.
3. BISHOP J.M.: Cellular Oncogenes and Retrovirus. Ann Rev Biochem 1983; 52: 301-354.
4. WEINBERG R.A.: Use of Transfection to analyse Genetic Information and Malignant Transformation. Biochem Biophys Acta. 1981; 651: 25-29.
5. BISHOP J.M.: The Molecular genetics of Cancer. Science 1987; 235: 305-311.
6. TEREBA A.: Chromosomal Localization of Protooncogenes. Int Rev Cytol 1985; 95: 2-43.
7. KAGAN J. & CROCE C.: Molecular Biology of Lymphoid Malignancies. Ann Oncol 1991; supp 2: 9-21.
8. MCKEITHAN T.W.: Molecular Biology of Non-Hodgkin's Lymphomas. Semin Oncol 1990; 17: 30-42.
9. Cannistra S.A.: Chronic Myelogenous Leukemia as a model for the Genetic basis of Cancer. Hematol/oncol Clin North America 1990; 4: 337-357.
10. EPNER D.E., KOEFFLER H.P.: Molecular Genetics Advances in Chronic Myelogenous Leukemia. Ann Int Med 1990; 113: 3-6.
11. HOCKENBERRY D., NUNEZ G., MILLIMAN C., SCREIBER R.D., KORSMEYER S.J.: Bcl2 is a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990; 348: 334-337.
12. LAND H., PARADA L.F., WEINBERG R.A.: Cellular Oncogenes and Multistep carcinogenesis. Science 1983; 222: 771-778.
13. TEMIN H.M.: Evolution of Cancer Genes as a mutation-driven process. Cancer Res 1988; 1697-1701.

14. ALBANES D., WINICK M.: Are cell number and cell proliferation risk factors for cancer?. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 772-775.
15. LUZZATTO L.: Leukaemia is a Genetic Disorder of Somatic Cells *Heamatologica* 1990; 75: 105-108.
16. PARREIRA L., KEARNEY L., RASSOL F., BABAPULLE V.B., MATUTES E., PARREIRA A., TAVARES DE CASTRO J., GOLDMAN J.M., CATOVSKY D.: Correlation between chromosomal abnormalities and blast phenotype in the blast crisis of Ph-positive CGL. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22: 29-34.
17. WEINBERG R.A.: Positive and negative controls on cell growth. *Biochem* 1989; 28: 263-269.
18. MURPHREE A.L., BENEDICT W.F.: Retinoblastoma: Clues to Human Oncogenesis. *Science* 1984; 223: 1028-1033.
19. RACKER E.: The Search for Oncogene Targets. *J Nat Cancer Inst* 1989; 81: 247-251.
20. WHITE P., BUCHKOVICH K.J., HOROWITZ J.M., FRIEND S.H., RAYBUCK M., WEINBERG R.A., HARLOW ED.: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-129.
21. LEE-W.H., BOOKSTEIN R., HONG F., YOUNG L-J, SHEW J-Y, LEE T-H P.: Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* 1987; 235: 1394-1399.
22. GREEN M.R.: When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* 1989; 56: 1-3.
23. EMERY A.E.: An introduction to Recombinant DNA. Portsmouth: John Wiley & Sons, 1984.
24. SOUTHERN E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
25. EISENSTEIN B.I.: The Polymerase Chain Reaction. A new method of using Molecular Genetics for Medical Diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 178-183.
26. KORSMEYER S.J.: Antigen Receptor Genes as Molecular Markers of lymphoid neoplasm. *J Clin Invest* 1987; 79: 1291-1295.
27. HALUSKA F.G., TSUJIMOTO Y., CROCE C.M.: Mechanism of Chromosome translocation in B and T-cell neoplasia. *Trends Genet* 1987; 3: 11-15.
28. TONEGAWA S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581.
29. MARRAK P., KAPPLER J.: The cell receptor. *Science* 1987; 238: 1073-1079.
30. FRIEDMANN T.: Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; 2245: 1275-1280.
31. HAUNG H-J S., YEE J-K, SHEW J-Y, CHEN P-L, BOOKSTEIN R., FRIEDMAN E., LEE E. Y-H, LEE W-H. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 1988; 242: 1563.
32. BORRELLI E., HEYMAN R., HSI M., EVANS R.M.: Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc. natl. Acad. Sci USA* 1988; 85: 7572-7576.
33. GREEN P.J., PINES O., INOUE M.: The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 569-597.
34. BRANDT S.J., PETERS W.P., ATWATER S.K., KURTZBERG J., BOROWITZ M.J., JONES R.B., SHPALL E.J., BAST R.C., GUILBERT C.J. OETTE D.H.: Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous marrow transplantation. *New Engl J Med* 1988; 318: 869-876.
35. WEST W.H., TAUER K.W., YANELLI J.R., MARSHAL G.D., ORR D.W., THURMAN G.B., OLDHAM R.K.: Constant infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *New. Engl J Med* 1987; 316: 898-905.
36. WAGSTAFF J., SCARFFE J.H., CROWTHER D.: Interferon in the treatment of multiple myeloma and the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rev* 1985; 12: 39-44.
37. FLANAGAN J.G. & RABBITTS T.H.: The sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non-allelic genes. *Embo J* 1982; 1: 655-660.
38. SIMS J.E., TUNNACLIFFE A., SMITH W.J., RABBITTS T.H.: Complexity of human T-cell antigen receptor β -chain constant and variable region genes. *Nature* 1984; 312: 541-545.

Pedido de Separatas:
 Leonor Parreira
 Instituto de Histologia e Embriologia
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 Av. Prof. Egas Moniz
 1699 Lisboa Codex