



Maria Aparecida Nagai

Trabalho realizado na Disciplina de Oncologia, Departamento de Radiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM CÂNCER DE MAMA

Rev bras Mastol 1995; 5(3): 31-41

UNITERMOS

Alterações genéticas;
Câncer de mama.

RESUMO

Evidências moleculares sugerem que o processo de tumorigênese da mama envolve o acúmulo de diversas alterações genéticas. Os eventos genéticos mais freqüentemente observados em câncer de mama são a amplificação de oncogenes (c-myc, c-int-2, c-erbB-2) e a inativação de genes supressores de câncer evidenciada pela ocorrência de perdas de heterozigose em diversos segmentos cromossômicos (1p, 3p, 6q, 11p, 11q, 13q, 16q, 17p, 17q e 18q) e pela ocorrência de mutações em genes supressores de câncer já clonados, como os genes TP53 e RB1. A detecção de alterações genéticas associadas ao câncer de mama permitirá uma melhor compreensão do processo de tumorigênese da mama e a identificação de marcadores moleculares que possam ser utilizados no diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença.

Os avanços na área de biologia molecular têm provocado grande impacto na Oncologia, ampliando nossa compreensão sobre as bases moleculares do câncer. Diversos conceitos associados ao processo de tumorigênese foram estabelecidos utilizando-se ferramentas da tecnologia de DNA recombinante, e nos últimos anos, o emprego da biotecnologia, objetivando a identificação dos eventos genéticos envolvidos no processo de tumorigênese, têm demonstrado que uma série de alterações genéticas se acumula durante o desenvolvimento e progressão tumoral.

Duas classes de genes associados ao processo neoplásico têm estado sob constante estudo durante os

últimos anos. Os mecanismos de ativação de proto-oncogenes, principalmente a amplificação gênica, bastante freqüente em tumores sólidos, e o estudo dos processos de inativação de genes supressores de tumor constituem-se nas duas maiores áreas de investigação em genética de câncer. Estas duas classes de genes incluem: a) os oncogenes, que são genes celulares normais (proto-oncogenes), que participam do processo de regulação positiva do crescimento celular e que quando ativados por mecanismos, tais como amplificação gênica, translocação, mutação ou rearranjo, codificam proteínas que conferem vantagens de crescimento para as células. Estes genes foram inicialmente associados às retrovíroses e

na sua grande maioria identificados através da capacidade do DNA advindo de células tumorais de transformar células normais em cultura; e b) os genes supressores de tumor, os quais estão presentes nas células normais e atuam na regulação do crescimento celular no sentido de bloquear a proliferação celular.

Ao contrário dos oncogenes, é a inativação dos genes supressores de tumor que contribui para o processo de tumorigênese. A ativação de um dos alelos de um oncogene está associada à aquisição da capacidade tumorigênica. No caso dos genes supressores de tumor, entretanto, a presença de um alelo normal é suficiente para inibir o fenótipo tumorigênico, e portanto, é necessária a inativação de ambos os alelos de um gene supressor de tumor para promover a desregulação do crescimento celular e desenvolvimento tumoral.

Não existem evidências indicando que um oncogene ou gene supressor de tumor em particular desempenhe uma função específica, exclusiva no processo de tumorigênese. Entretanto, há um consenso geral de que o fenótipo maligno seja o resultado do acúmulo de alterações genéticas envolvendo oncogenes e genes supressores de tumor e que diferentes combinações de alterações genéticas em diferentes tumores podem colaborar de maneira específica durante o processo de tumorigênese.

Alterações genéticas em câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea, de curso variável e que atinge uma grande parcela da população feminina mundial. Diversas análises genéticas em tumores de mama sugerem que uma variedade de alterações genéticas adquiridas somaticamente contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Amplificação gênica é um mecanismo de ativação de oncogenes freqüentemente observado em câncer de mama e que tem sido associado a um fenótipo mais agressivo da doença. Amplificação e ou aumento de expressão dos protooncogenes *c-myc*, *c-erbB-2* e *c-int-2* têm sido associados a um pior prognóstico em câncer de mama^{1, 12, 34, 37}.

Perdas de heterozigose (LOH) representam um dos eventos genéticos mais freqüentes em tumores sólidos. Regiões do genoma freqüentemente deletadas são consideradas como sendo regiões de localização de genes supressores de tumor²⁵. Alta frequência de LOH sobre os cromossomos 1p34-36, 1q23-32, 3p21-25, 6q, 11p15, 13q, 16q, 17p, 17q e 18q tem sido observada em tumores de mama, indicando que a inativação de potenciais genes supressores de tumor localizados nessas regiões cromossômicas contribui para o processo de tumorigênese

da mama^{10, 32}. Em adição, são também observadas a ocorrência de mutação em genes supressores já clonados, como o TP53 e RB1, e alteração na expressão do gene antimetástase nm23 (tabela 1).

Tabela 1

Alterações genéticas em carcinomas de mama		
Amplificação gênica e/ou aumento de expressão		
<i>c-int-2</i>	10-20%	Ativação de oncogenes
<i>c-myc-2</i>	10-30%	
<i>c-erbB-2</i>	10-40%	
Perda de heterozigose (LOH) > 25%		
1p, 1q, 2p		
3p, 5q, 6q		
7q, 8q, 9p	Perdas de segmentos cromossômicos	
9q, 10q, 11p	envolvendo potenciais genes	
11q, 13q, 14q	supressores de tumor	
14q, 15q, 16q		
17p, 17q, 18q		
Mutações		
RB1 Genes supressores já clonados		
TP53		
Diminuição da expressão do gene antimetástase nm23		

Amplificação e aumento de expressão do oncogene *c-myc*

O gene *c-myc* é um dos membros da família de genes *myc* (*c-myc*, *N-myc* e *L-myc*), é homólogo ao oncogene viral *v-myc*, que induz carcinomas e leucemias em aves e felinos. O gene *c-myc* está localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q24) e codifica para uma fosfoproteína nuclear, a qual possui na sua estrutura domínios funcionais característicos de proteínas que atuam como fator de transcrição, ou seja, proteínas capazes de se ligarem a sítios específicos no DNA, a fim de modular a transcrição gênica. Diversas evidências indicam que o protooncogene *c-myc* está envolvido no controle de proliferação e diferenciação celular e no mecanismo de apoptose¹³.

Amplificação e ou aumento de expressão do oncogene *c-myc* têm sido observadas em diversos tipos de tumores, sugerindo que o gene *c-myc* ativado possa desempenhar um importante papel biológico no proces-

so de tumorigênese. Em câncer de mama alterações genéticas envolvendo o oncogene *c-myc* foram observadas em linhagens celulares em cultura¹⁷ e em tumores primários^{12, 29}. A incidência de amplificação e ou aumento de expressão do oncogene *c-myc* observadas na literatura é bastante variável, e a existência ou não de uma associação entre a ocorrência de alterações genéticas no *c-myc* e o fenótipo agressivo do tumor ainda não está estabelecida. A frequência de amplificação observada varia de 10 a 40% e o aumento de expressão de 26 a 100%^{12, 20, 29, 39}.

Em estudo recente avaliamos o nível de expressão do oncogene *c-myc* em 105 carcinomas de mama primários e observamos a ocorrência de superexpressão em 27,6% desses tumores (figura 1). No grupo de tumores por nós avaliado, o aumento de expressão de *c-myc* apresentou associação significativa com índice mitótico e infiltração linfocitária (tabela 2), mas não com outras características clínico-patológicas de significado prognóstico, como tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos e receptores para hormônios esteróidicos.

Embora existam poucos dados na literatura sobre o valor prognóstico de *c-myc* em câncer de mama; alguns estudos mostram uma correlação significativa entre a ocorrência de amplificação^{37, 39} e/ou superexpressão²⁰ do

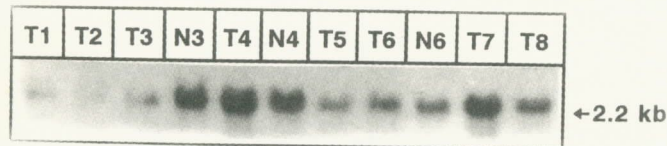


Figura 1. Autorradiograma representativo da análise da expressão do oncogene *c-myc* em biópsias de carcinoma de mama primário. Para a análise de Northern blot, 10 µg de RNA total de cada amostra foram denaturadas com formaldeído, separadas em gel de agarose 1% e transferidas para membranas de nylon. Os filtros obtidos foram hibridizados com a sonda de *c-myc* marcada com ³²P e expostos a filme de raio X. N, RNA do tecido normal; T, RNA do tecido tumoral.

oncogene *c-myc* em carcinomas de mama primários e o prognóstico desfavorável da doença, indicando que alterações genéticas envolvendo o oncogene *c-myc* podem contribuir para a progressão do câncer de mama. Em um estudo recente, Berns e col.¹, analisando 282 pacientes com câncer de mama primário, sugerem a amplificação do oncogene *c-myc* como sendo melhor fator prognóstico do que a amplificação de *c-erbB-2*, particularmente nas pacientes linfonodo-negativas e receptor de estrógeno positivas.

Amplificação e aumento de expressão do oncogene *c-erbB-2*

O protooncogene *c-erbB-2* foi primeiramente identificado como sendo potencialmente oncogênico em neuroblastomas de rato induzidos por etilnitrosuréia. O *c-erbB-2* está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q12-21.3) e codifica para uma glicoproteína de 185 kDa com domínio intracelular com atividade de proteína quinase, que apresenta homologia com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Resultados experimentais utilizando células derivadas de carcinoma de mama em cultura demonstraram que a superexpressão do gene *c-erbB-2* contribui no processo de transformação celular.

O interesse clínico na determinação das alterações genéticas envolvendo o oncogene *c-erbB-2* foi estimulado, principalmente, pelas observações de Slamon e col.³⁴, que demonstraram uma associação entre o aumento do número de cópias do gene *erbB-2* e outros indicadores de prognóstico desfavorável. A hipótese é a de que alterações genéticas no protooncogene *c-erbB-2*, aumentando o nível de atividade de proteína quinase nas células da mama, podem ser um importante fator predispondo a um fenótipo mais agressivo. Nos últimos anos, com o objetivo de avaliar o envolvimento de alterações genéticas em protooncogenes no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, o protooncogene *c-erbB-2* tem sido o alvo de muitos estudos. Apesar da importância biológica que o *c-erbB-2* possa desempenhar na etiologia do câncer de mama, os dados encontrados na literatura são bastante controversos com relação à frequência de amplificação e/ou aumento de expressão que variam de 10 a 46% nos carcinomas de mama primários⁵, e ao valor prognóstico de *c-erbB-2* em câncer de mama^{1, 5, 26, 34}. Os resultados obtidos, por diferentes investigadores, sobre as associações entre a ocorrência de alterações genéticas no oncogene *c-erbB-2* com outros fatores prognósticos em câncer de mama têm variado consideravelmente, principalmente com relação a tamanho do tumor status de receptores de estrógeno e progesterona e envolvimento de linfonodos^{1, 5, 34}. Embora a presença de amplificação e/ou superexpressão do *c-erbB-2* seja mais frequentemente observada em tumores em estadiamento avançado (III e IV), alterações genéticas no *c-erbB-2* foram observadas pelo nosso grupo e por outros em tumores de mama em todos os estadiamentos clínicos^{26, 34}, sugerindo que a ativação do gene *c-erbB-2* seja um evento inicial biologicamente importante no processo de tumorigênese da mama e que é mantido durante a progressão do tumor.

Tabela 2

Associações entre o aumento de expressão do oncogene *c-myc* e as características clínico-patológicas de pacientes com carcinomas de mama primários

Características		Expressão do oncogene <i>c-myc</i>		<i>p</i>
		Normal	Aumentada (≥ 2 vezes)	
Status menopausal	pré	33	11	0,61
	pós	43	18	
Idade (anos)	≤ 50	37	13	0,89
	> 50	39	16	
Envolvimento de linfonodos	Negativo	19	8	0,22
	Positivo	50	15	
Tamanho do tumor (cm)	≤ 4	36	14	0,87
	> 4	36	13	
Tipo histológico	Ductal infiltrativo	69	22	0,056
	Medular	2	4	
	Lobular	4	1	
	Outros	2	1	
Infiltração linfocitária	Intensa	9	7	0,026
	Moderada	29	4	
	Ausente	21	9	
Índice mitótico ^a	1-10	24	4	0,05
	11-20	24	9	
	> 20	19	13	
Necrose	Presente	35	14	0,83
	Ausente	25	9	
Receptor de estrogênio	≤ 10 fM/mg prot.	31	13	0,76
	> 10 fM/mg prot.	41	15	
Receptor de progesterona	≤ 20 fM/mg prot.	40	17	0,64
	> 20 fM/mg prot.	32	11	

^a Número de figuras mitóticas por campo.

Diversos estudos têm demonstrado uma associação significativa entre a presença de amplificação e/ou superexpressão de *c-erbB-2* e o prognóstico desfavorável da doença^{34, 37}. Recentemente, avaliamos a ocorrência de amplificação e aumento de expressão do oncogene *c-erbB-2* em 65 carcinomas de mama primários, onde observamos amplificação gênica em 32,3% e elevados níveis de expressão em 23,3% dos tumores examinados²⁶

(figura 2). Nesse estudo, nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre a ocorrência de amplificação e/ou superexpressão de *c-erbB-2* com outros fatores prognósticos da doença. Entretanto, a análise de seguimento das pacientes mostrou uma associação significativa entre as alterações genéticas observadas e o prognóstico desfavorável das pacientes (figura 3), ou seja, pacientes que apresentaram ampli-

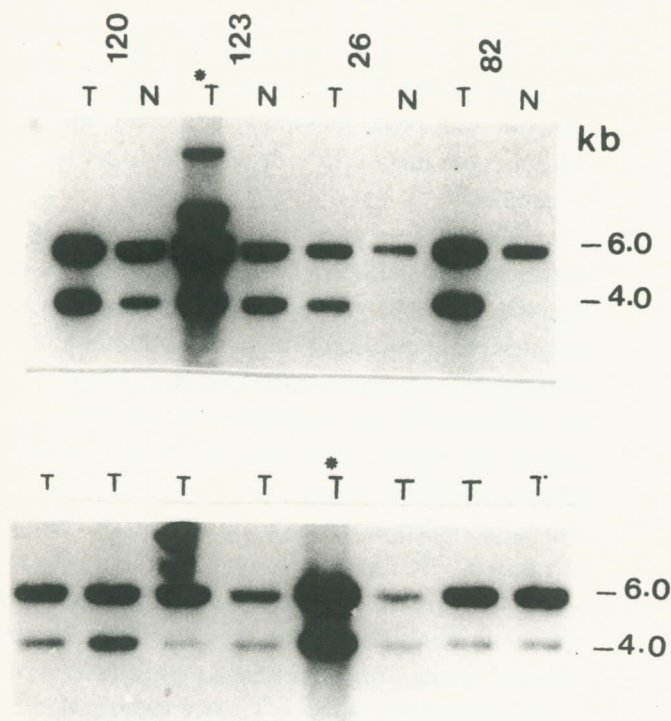


Figura 2. Autorradiogramas representativos da análise de alteração no oncogene *c-erbB-2* em carcinomas de mama primários. Para a análise de Southern blot, 10 µg de DNA genômico foram digeridas com a enzima EcoRI, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferidos para membranas de nylon e hibridizados com a sonda Mac30 (*c-erbB-2*) marcada com ³²P. *DNA do tumor 123TL foi analisado novamente, para testar possível ocorrência de rearranjo. Apenas amplificações foram observadas.

ficação e aumento de expressão, bem como aquelas cujos tumores apresentaram alto nível de amplificação (> 5 cópias do gene) para o oncogene *c-erbB-2*, apresentaram um maior risco de recorrência da doença.

Embora os dados encontrados na literatura sejam controversos quanto ao valor prognóstico da determinação de alterações genéticas no oncogene *c-erbB-2* em câncer de mama, a maioria dos dados indica que a amplificação e/ou aumento de expressão desse oncogene estão associados a tumores mais agressivos, e portanto ao prognóstico desfavorável da doença, podendo selecionar grupos de pacientes que se beneficiariam de uma quimioterapia adjuvante ou servir como alvo para imunoterapia. Estudos recentes mostram que a forma solúvel da proteína *c-erbB-2* pode ser detectada no soro por ensaio imunoenzimático¹⁸. Assim sendo, a medida do nível sérico de *c-erbB-2* poderia ser utilizada para monitorar a recorrência após a cirurgia. Além disso, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-*c-erbB-2*, que se ligam com

alta afinidade ao domínio extracelular da proteína *c-erbB-2* provocando inibição do crescimento de tumores que apresentem aumento de expressão de *c-erbB-2*, estão sob investigação e podem vir a desempenhar importante papel na terapêutica da doença.

Alterações genéticas envolvendo o cromossomo 17

Alterações genéticas envolvendo o cromossomo 17 são particularmente significantes na tumorigênese da mama incluindo, além da amplificação do oncogene *c-erbB-2*, mutações no gene supressor de tumor TP53 e perdas de heterozigose sobre o braço curto (17p) e o braço longo (17q) desse cromossomo. Estudos sobre perda de heterozigose em câncer de mama familiar e esporádico indicam a existência de pelo menos cinco regiões distintas de perda de heterozigose sobre o cromossomo 17 (figuras 4 e 5). Múltiplos genes supressores de tumor que podem ser importantes na etiologia do câncer de mama estão localizados sobre esse cromossomo, incluindo os genes da proibirina³³, NM23 (17q22)¹⁹, BRCA1 (17q21)²⁴, TP53 (17p13.1) e pelo menos dois outros genes supressores de tumor ainda não identificados^{7, 27}.

Mutações no gene p53

O gene supressor de tumor TP53 mapeado sobre o cromossomo 17p13.1 codifica para uma fosfoproteína de 53kDa, que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular e previne o aparecimento do câncer. A proteína p53 recebeu recentemente o título de “guardião do genoma” pelo seu papel de bloquear a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu DNA, em alguns casos levando a uma resposta apoptótica¹⁶.

Mutações no gene p53 têm sido detectadas em uma variedade de tumores humanos representando um dos eventos genéticos mais comuns associados à tumorigênese humana³⁵. Da grande maioria dessas mutações resulta uma proteína anormal com uma meia-vida aumentada e que, em consequência, se acumula nas células. O acúmulo da proteína p53 é geralmente, mas nem sempre, devido à ocorrência de mutação, e além disso, diferentes mutações podem ter diferentes efeitos sobre a conformação da proteína e sobre a sua atividade biológica. A proteína p53 apresenta diferentes domínios funcionais, e mutações em regiões diferentes da molécula podem resultar em diferentes efeitos biológicos. Um grande número de anticorpos, reconhecendo diferentes regiões ou epitopos

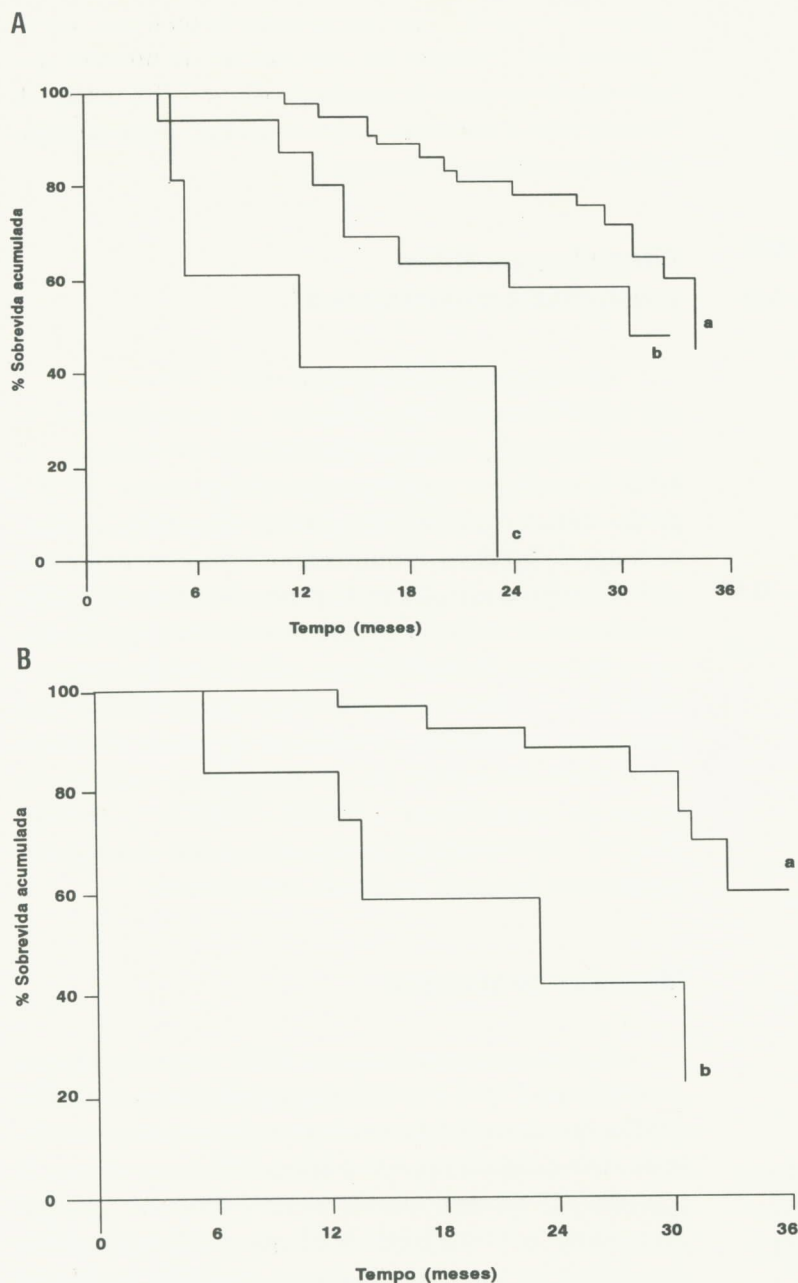


Figura 3. Curvas de intervalo livre de doença em pacientes com câncer de mama primário em função de alterações genéticas no oncogene *c-erbB-2*. A) Amplificação gênica e aumento de expressão: a. Pacientes com tumores sem amplificação do oncogene *c-erbB-2* (simples cópia); b. Pacientes com tumores que apresentaram amplificação gênica moderada do oncogene *c-erbB-2* (2 a 5 cópias); c. Pacientes com tumores que apresentaram alto grau de amplificação do oncogene *c-erbB-2* (>5 cópias). $p=0.04$. B) Amplificação e aumento de expressão: a. Pacientes com tumores sem alteração genética para o oncogene *c-erbB-2*; b. Pacientes com tumores que apresentaram amplificação e aumento de expressão para o oncogene *c-erbB-2*. $p=0.03$.

da proteína normal e mutada, foram desenvolvidos para detectar o acúmulo da p53. Diversos estudos utilizando imunohistoquímica têm observado acúmulo de p53 em

câncer de mama e uma boa correlação entre os resultados de imunohistoquímica, e a ocorrência de mutação, detectada por métodos moleculares, tem sido observada quando se consideram tumores com pelo menos 25% de células positivamente coradas⁹.

Mutações no gene p53 em câncer de mama foram identificadas em cerca de 15 a 40 % dos tumores esporádicos^{6,31} e na linhagem germinativa de pacientes com síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome de câncer hereditário associado ao câncer de mama²¹. Essas mutações em carcinomas de mama esporádicos têm sido associadas com alto grau histológico, baixos níveis de receptor de estrógeno e progesterona e alta fração de células em fase S^{31, 36}. Entretanto, os dados relativos ao valor prognóstico de alterações no gene p53 em câncer de mama são bastante controversos. Alguns estudos relatam uma associação entre a ocorrência de mutação no gene p53 e pior prognóstico da doença³⁶, enquanto outros falham em demonstrar o valor prognóstico do p53 em pacientes com câncer de mama³⁰.

Perdas de heterozigose sobre o cromossomo 17

A frequência de mutações no gene p53 em câncer de mama é significativamente menor do que a frequência de LOH observada para o marcador D17S5 (YNZ22.1) localizado na região 17p13.3 distal ao gene p53. Duas regiões distintas de deleção foram identificadas nessa mesma região, uma envolvendo o gene p53 e a outra mais telomérica, distal ao p53, envolvendo o marcador D17S5, indicando a existência de outro gene supressor de tumor nessa região^{7, 27}. Perdas de heterozigose para o marcador D17S5 (17p13.3) têm sido correlacionadas com alta capacidade proliferativa²³ e com risco de recorrência²⁷ em carcinomas de mama primários (figura 6). Estudos envolvendo maior número de pacientes, mapeamento utilizando maior número de marcadores de DNA polimórfico para essa região e a clonagem do gene alvo para essas deleções serão necessários para confirmar se alterações genéticas envolvendo o cromossomo 17 distal ao p53 possam vir a ser utilizadas como indicador de prognóstico em câncer de mama.

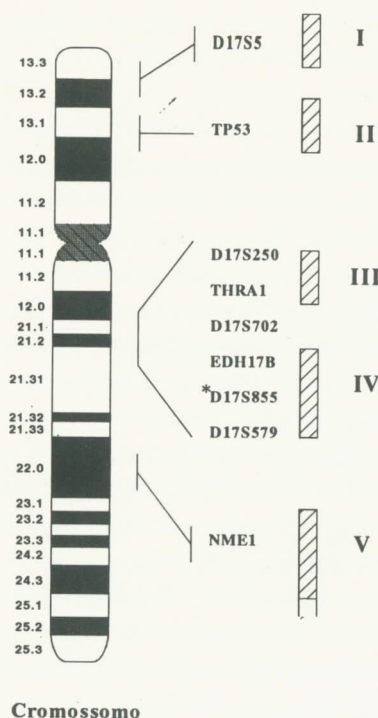


Figura 4. Representação esquemática das regiões de deleção sobre o cromossomo 17 observadas em carcinomas de mama esporádicos. Para o mapeamento de deleção foram utilizados marcadores de DNA polimórfico do tipo micro-satélite, os marcadores utilizados no mapeamento da região 17q21 são os mesmos utilizados nos estudos de ligação genética para câncer de mama e ovário familiar. O marcador D17S855 está localizado em um intron do gene BRCA1.

Nos últimos anos, com o auxílio de um grande número de marcadores polimórficos, construiu-se um mapa de alta densidade para o cromossomo 17q. Diversos grupos têm fornecido evidências indicando a existência de pelo menos três regiões distintas de perda de heterozigose sobre o braço longo do cromossomo 17 em carcinomas de mama esporádicos^{8,28}. Uma dessas regiões (região IV, figura 4) envolve o gene BRCA1, recentemente clonado²⁴, o qual confere susceptibilidade genética a cerca de 45% das famílias com câncer de mama e à maioria das famílias com câncer de mama e ovário¹¹. Perdas de heterozigose afetando a região IV (figura 4), entre os marcadores D17S776 e D17S579, incluindo o marcador D17S855, que está localizado em um dos introns do gene BRCA1²⁴ foi observada em 33% dos carcinomas de mama esporádicos por nós analisados²⁸. O gene BRCA1, entretanto, não parece ser o gene alvo para as mutações somáticas em tumores esporádicos. Nenhuma mutação somática afetando o gene BRCA1 foi observada em um estudo analisando 32 tumores de mama e 12 tumores de ovário esporádicos, que apresentavam LOH para a região 17q (região IV)¹⁵. Esses resul-

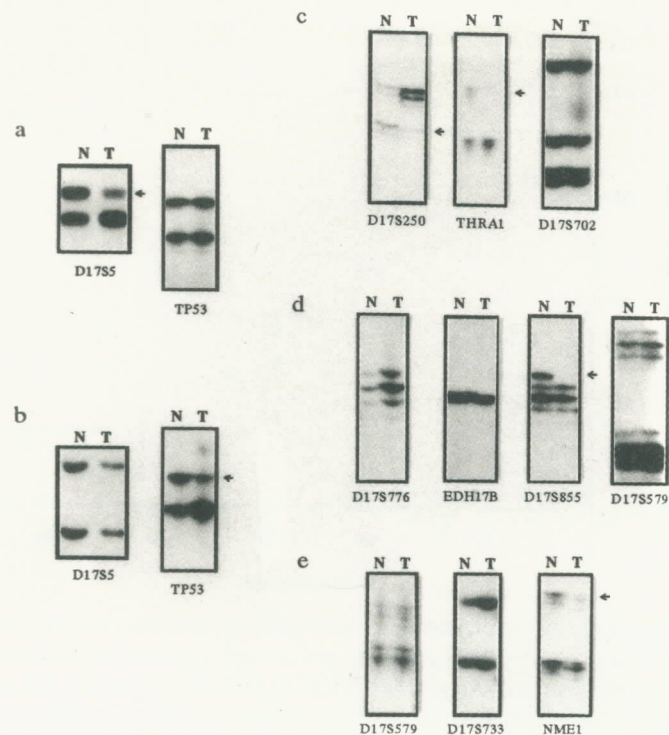


Figura 5. Autorradiogramas representativos da análise de LOH para as cinco regiões de deleção no cromossomo 17 em carcinomas de mama primários representadas na figura 4. O marcador D17S5 (17p) foi analisado por Southern blot como descrito na figura 7. A análise de LOH para os demais loci foi feita por PCR (reação em cadeia da polimerase). a, Tumor informativo apresentando LOH para D17S5 e retendo a heterozigose para TP53 (região I); b, Tumor informativo retendo a heterozigose para D17S5, mas apresentando LOH para TP53 (região II); c, Tumor informativo apresentando LOH para os marcadores D17S250 e THRA1, mas retendo a heterozigose para D17S702 (região III); d, Tumor informativo apresentando perda de heterozigose para o marcador D17S855, mas retendo a heterozigose para D17S776 e D17S579 (região IV); e e, Tumor informativo retendo a heterozigose para D17S579 e D17S733, mas apresentando LOH para NME1 (região V). As setas indicam a ocorrência de LOH. N, DNA do tecido normal. T, DNA do tecido tumoral.

tados sugerem que um outro potencial gene supressor de tumor, localizado muito próximo ao BRCA1, pode desempenhar um papel biológico importante em um subgrupo de carcinomas de mama esporádicos.

Combinações entre alterações genéticas

Um modelo molecular para a progressão tumoral foi claramente delineado para o câncer de cólon¹⁴, onde a progressão de adenoma para carcinoma foi cor-

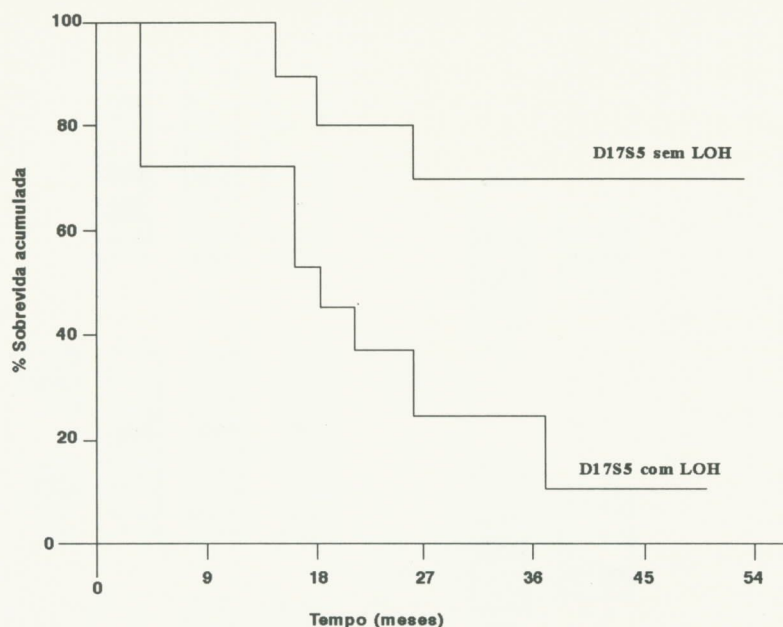


Figura 6. Curvas de intervalo livre de doença em pacientes com câncer de mama primário estratificadas de acordo com a ocorrência de perda de heterozigose para o marcador D17S5 (17p13.3). D17S5 sem LOH (N=14)= pacientes informativas (heterozigotas) com tumores que retiveram a heterozigose para os marcadores D17S5 e TP53; D17S5 com LOH (N=7)= pacientes informativas para os marcadores D17S5 e TP53, com tumores que apresentaram perda de heterozigose para D17S5, mas retiveram a heterozigose para TP53; $p=0.007$.

relacionada com o acúmulo de alterações genéticas específicas que seguem uma ordem seqüencial. Diversos estudos mostraram a ocorrência de alterações genéticas envolvendo diferentes loci (incluindo oncogenes e genes supressores de tumor) em diversos tipos de tumores humanos. Entretanto, até o momento não há nenhuma evidência concreta de ordem temporal na qual eventos genéticos individuais ocorram durante a progressão desses

Figura 7. Amplificação do oncogene *c-erbB-2* em tumores informativos (heterozigotos) para o marcador D17S5. Para a análise de Southern blot, 10 µg de DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição TaqI por 6 a 12 hrs a 65° C, o DNA digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferido para membranas de nylon. Para a análise de dot blot, diluições contendo 10,0 - 0,3125 µg de DNA genômico foram denaturadas com alkali e aplicadas a membranas de nylon utilizando um aparelho de dot blot (Gibco-BRL). Os filtros de Southern e dot blot obtidos foram hibridizados com as sondas YNZ22.1 (D17S5) e Mac30 (*c-erbB-2*) marcadas com ^{32}P , respectivamente. Paciente 92, tumor sem alteração genética para D17S5 ou *c-erbB-2*; paciente 101, tumor sem perda de heterozigose para D17S5, mas com amplificação para o oncogene *c-erbB-2*; paciente 69, tumor com perda de heterozigose para D17S5, mas sem amplificação para *c-erbB-2*; e paciente 28, tumor com perda de heterozigose para D17S5 e amplificação para *c-erbB-2* (> 5 cópias). N, DNA do tecido normal; T, DNA do tecido tumoral.

tumores. Na verdade, o acúmulo de alterações genéticas parece ser mais importante para o processo de tumorigênese do que a ordem na qual eles ocorrem¹⁴.

Diversos grupos têm investigado a existência de correlação entre os diferentes eventos genéticos que ocorrem em câncer de mama e qual a importância biológica e clínica de diferentes subgrupos de mutações. Correlações entre a ativação de oncogenes e perdas de heterozigose envolvendo diferentes segmentos cromossômicos têm sido observadas em tumores de mama, sem entretanto terem apresentado relação significativa com marcadores de agressividade tumoral. Em um estudo recente Cheikh e col.⁴, analisando a ocorrência de perdas de heterozigose em sete cromossomos e amplificação em cinco oncogenes, em um painel de 191 carcinomas de mama, demonstraram a existência de associações entre a ocorrência de LOH sobre o cromossomo 1p e 17p, e entre LOH sobre o cromossomo 11p e 17p. Nesse estudo foram também observadas associações entre LOH sobre o cromossomo 11p e amplificação do oncogene *erbB-2* e entre LOH sobre o

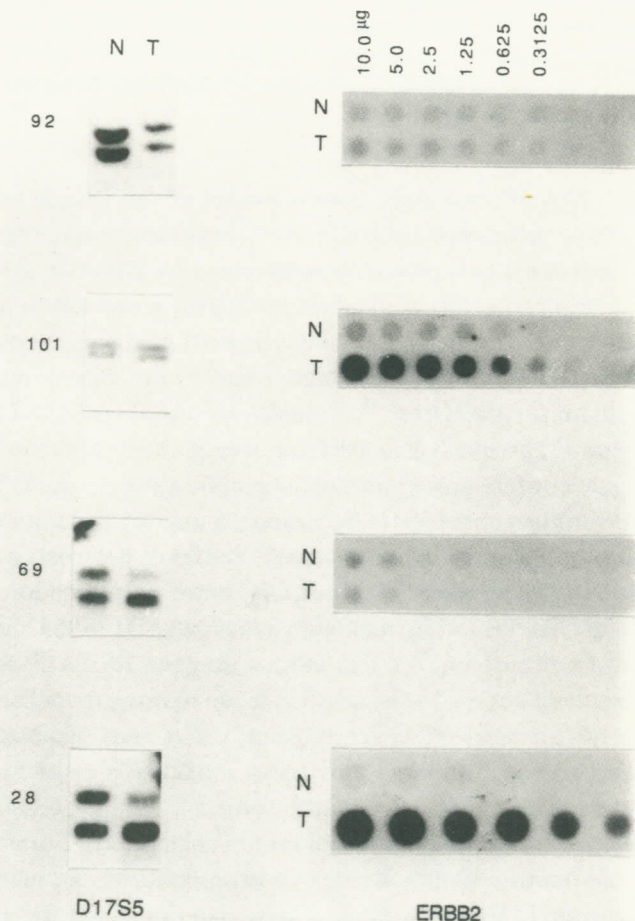


Tabela 3

Risco de recorrência em função de marcadores sobre o cromossomo 17 em 42 pacientes com câncer de mama primário

Categorias	Risco relativo ^a			
	Sem ajuste ^b	<i>p</i>	Ajustado pelo status de linfonodos ^c	<i>p</i>
D17S5 LOH-/c- <i>erbB</i> -2 simples cópia	1,0 ^d		1,0	
D17S5 LOH-/c- <i>erbB</i> -2 amplificado	3,7		3,3	
D17S5 LOH-/c- <i>erbB</i> -2 simples cópia	7,2		5,0	
D17S5 LOH-/c- <i>erbB</i> -2 amplificado	6,8	0,029 ^e	13,2	0,010

^aModelo proporcional de Cox. ^bRisco relativo considerando-se a população total de pacientes analisados, pacientes negativos e positivos quanto ao envolvimento de linfonodos. ^cRisco relativo considerando-se somente pacientes linfonodo positivos.

^dCategoria de referência, pacientes cujos tumores não apresentaram nenhuma das alterações genéticas analisadas. ^ePacientes com perda de heterozigose para D17S5 e com amplificação de c-*erbB*-2 versus pacientes sem nenhuma dessas alterações genéticas. D17S5 LOH-, sem perda de heterozigose para D17S5. D17S5 LOH+, com perda de heterozigose para D17S5.

cromossomo 17p e amplificação do oncogene *flg*, definindo diferentes subgrupos de tumores e indicando um possível papel cooperativo entre esses diferentes subgrupos de mutações na progressão do câncer de mama. Bièche e col.², observaram uma associação significativa entre a ocorrência de perda de heterozigose sobre o cromossomo 1p e amplificação no oncogene *c-myc* em carcinomas de mama primários e sugerem que a inativação de um potencial gene supressor de tumor sobre o braço curto do cromossomo 1 poderia estimular a amplificação do oncogene *c-myc*, contribuindo, assim, para a progressão de um subgrupo de tumores de mama.

Alguns estudos têm relatado a existência de uma associação entre a amplificação do oncogene *c-erbB*-2 e o acúmulo da proteína p53. Em um estudo recente, Marks e col.²² sugerem que a amplificação do oncogene *c-erbB*-2 e mutações no gene p53 sejam eventos independentes, que *c-erbB*-2 tem um valor prognóstico no risco de recorrência maior que o p53, mas que alterações genéticas em ambos os genes podem ter um efeito aditivo se considerado o envolvimento de linfonodos. Além disso, há indicações da existência de maior frequência de amplificação para o oncogene *c-erbB*-2 em tumores com perdas de heterozigose sobre o cromossomo 17³². Entretanto, a mesma associação não foi observada por outros grupos^{3, 38}. Recentemente, mostramos que LOH para o cromossomo 17p e amplificação do oncogene *c-erbB*-2 são independentemente associados a risco de recorrência em câncer de mama e que a combinação desses dois eventos genéticos e o envolvimento de linfonodos são aditivos

para indicar pacientes com maior risco de recorrência²⁷ (tabela 3). Esses dados sugerem que a combinação de alterações genéticas específicas em diferentes subgrupos de tumores podem ter um efeito cooperativo para o desenvolvimento do fenótipo maligno. Entretanto, a determinação de subgrupos de eventos genéticos que definam diferentes subgrupos de tumores de mama com diferentes fenótipos e que, conseqüentemente, possam vir a ser utilizados como fatores prognósticos requer ainda o estudo de múltiplos eventos genéticos em grandes painéis de tumores de mama, bem documentados quanto aos dados clínico-patológicos e de seguimento das pacientes.

Comentários finais

A identificação de marcadores que possam prever o comportamento do tumor é especialmente importante em câncer de mama devido à variabilidade na progressão clínica da doença. Nos últimos anos, estudos utilizando técnicas de biologia molecular têm aumentado a nossa compreensão sobre as bases moleculares do câncer de mama, fornecendo dados valiosos sobre os eventos genéticos associados à etiologia e comportamento da doença. Enfoque especial tem sido dado à obtenção de marcadores prognósticos moleculares independentes, com capacidade de prever o risco de recorrência em pacientes sem evidência histológica de disseminação da doença para os linfonodos axilares, uma vez que 30% das pacientes linfonodo-negativas recorrem na doença dentro de um

período de 5 anos a partir do diagnóstico. Entretanto, muitos estudos prospectivos em grandes painéis de pacientes ainda serão necessários para determinarmos quais são os eventos genéticos associados aos estádios iniciais e/ou aos diferentes estágios de progressão da doença, e quais as alterações genéticas, isoladas ou em combinação, que poderão ser utilizadas para o assessoramento de risco, diagnóstico, prognóstico e terapia.

De um modo geral, a análise de marcadores moleculares de uso prognóstico em tumores está apenas se iniciando, e a extensão na qual esses marcadores

irão alterar a prática oncológica é ainda uma incógnita. É possível que alguns desses marcadores venham a ser utilizados de maneira complementar aos métodos convencionais, enquanto outros venham revolucionar tais métodos. Atualmente, poucos são os eventos moleculares suficientemente bem estudados, quanto ao papel desempenhado no processo de tumorigênese, que possam ser aplicados na clínica; entretanto, em um futuro não muito distante poderemos ver os resultados das ciências básicas serem aplicados à prática oncológica.

KEY WORDS

Breast cancer;
Genetic alterations.

ABSTRACT

GENETIC ALTERATIONS IN BREAST CANCER

Molecular evidence suggests that the tumorigenic process of the breast involves the accumulation of several genetic alterations. The most frequent genetic events associated with breast cancer are oncogenes amplification (*c-myc*, *c-int-2*, *c-erbB-2*) and tumor suppressor genes inactivation as suggested by the occurrence of loss of heterozygosity at several chromosome arms (1p, 3p, 6q, 11p, 11q, 13q, 16q, 17p, 17q, and 18q) and mutations at cloned tumor suppressor genes (TP53, RB1). The detection of genetic alterations associated with breast cancer will enhance our understanding of the molecular basis of breast tumor development and progression allowing the identification of molecular markers which may be useful in the diagnosis, prognosis and treatment of the disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERNIS EMJJ, KLIJIN JGM, PUTTEN WLJ et al. *C-myc* amplification is better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1107-1113.
2. BIÈCHE I, CHAMPÈME MH, LIDEREAU R. A tumor suppressor gene on chromosome 1p32-pter controls the amplification of *myc* family genes in breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4274-4276.
3. BORRENSSEN A-L, OTTESTAD L, GAUSTAD A et al. Amplification and protein over-expression of the *neu/HER-2/c-erbB-2* protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. *Br J Cancer* 1990; 62: 585-590.
4. CHEICKH MB, ROUANET P, LOUASON G et al. An attempt to define sets of cooperating genetic alterations in human breast cancer. *Int J Cancer* 1992; 51: 542-547.
5. CLARK GM, McGUIRE WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 944-948.
6. COLES C, CONDIE A, CHETTY U et al. p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5291-5298.
7. COLES C, THOMPSON AM, ELDER PA et al. Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. *Lancet* 1990; 336: 761-763.
8. CROPP CS, CHAMPÈME M-H, LIDEREAU R et al. Identification of three regions on chromosome 17q in primary human breast carcinomas which are frequently deleted. *Cancer Res* 1993; 53: 5617-5619.
9. DAVIDOFF AM, KERNS BJM, IGLEHART JD et al. Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991; 51: 2605-2610.
10. DEVILEE P, VAN VLIET M, VAN SLOUN P et al. Allelotype of human breast carcinoma: a second major site for loss of heterozygosity in chromosome 6q. *Oncogene* 1991; 6: 1705-1711.
11. EASTON DF, BISHOP DT, FORDD et al. Genetic analysis in familial breast and ovarian cancer: Results from 214 families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678-701.
12. ESCOT C, THEILLET C, LIDEREAU R et al. Genetic alteration of the *c-myc* protooncogene (*myc*) in human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4834-4838.

13. EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell* 1992; 59: 119-128.
14. FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal carcinomas. *Cell* 1990; 61: 759-767.
15. FUTREAL PA, LIU Q, SHATTUCK-EIDANS D et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994; 266: 120-122.
16. LANE DP. The regulation of p53 function: Steiner Award Lecture. *Int J Cancer* 1994; 57: 623-.
17. LAVIALLE C, MODJTAHEDIM, CASSINGENA R et al. High amplification level contributes to the tumorigenic phenotype of the human breast carcinoma cell line SW 613-S. *Oncogene* 1988; 3: 335-339.
18. LEITZEL K, TERAMOTO Y, SAMPSON E et al. Elevated soluble *c-erbB-2* antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1992; 9: 1436-1443.
19. LEONE A, McBRIDE OW, WESTON A et al. Somatic allelic deletion of nm23 in human Cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2490-2493.
20. LOCKER AP, DOOWLE CS, ELLES IO et al. *C-myc* oncogene product expression and prognosis in operable breast cancer. *Int J Cancer* 1989; 45: 669-672.
21. MALKIN D, LI FP, STYRONG LC et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcoma and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238.
22. MARKS JR, HUMPHREY PA, WU K et al. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg* 1994; 219: 332-341.
23. MERLO GR, VENESIO T, BERNARDI A et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17p13 in breast carcinomas identifies tumors with high proliferation index. *Am J Pathol* 1992; 140: 215-223.
24. MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D et al. Isolation of BRCA1, the 17q-linked breast and ovarian cancer susceptibility gene. *Science* 1994; 266: 66-71.
25. MIKKELSEN T, CAVENEE WK. Suppressors of the malignant phenotype. *Cell Growth & Different* 1990; 4: 201-207.
26. NAGAI MA, MARQUES LA, TORLONI H et al. Genetic alterations in *c-erbB-2* protooncogene as prognostic markers in human primary breast tumors. *Oncology* 1993; 50: 412-417.
27. NAGAI MA, PACHECO MM, BRENTANI, MM et al. Allelic loss on distal chromosome 17p is associated with poor prognosis in a group of Brazilian breast cancer patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 754-758.
28. NAGAI MA, YAMAMOTO L, SALAORNI S et al. Detailed deletion mapping of chromosome segment 17q12-21 in sporadic breast tumours. *Genes Chrom Cancer* 1994; 11: 58-62.
29. OSHIMA CTF, NAGAIMA, MARQUES LA et al. Analysis of *c-myc* mRNA expression in primary breast carcinomas with clinical follow-up. *Inter J Oncol* 1995; 6: 719-723.
30. OSTROWSKI JL, SAWAN A, HENRY L et al. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factor: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991; 164: 75-81.
31. SASA M, KONDO K, KOMAKI K et al. p53 alteration correlates with negative ER, negative PgR, and High Histologic Grade in breast cancer. *J Surg Oncol* 1994; 56: 46-50.
32. SATO T, TANIGAMI A, YAMAKAWA K et al. Allelotype of breast cancer: Cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7184-7189.
33. SATO T, SAITO H, WENSEN J et al. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1643-1646.
34. SLAMONDJ, CLARK GM, WONG SG et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
35. SOUSSI T, LEGROS Y, LUBIN R et al. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: A review. *Int J Cancer* 1994; 57: 1-9.
36. THOR AD, MOORE DHII, EDGERTON SM et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-855.
37. TSUDA H, HIROHASHI S, SHIMOSATO Y et al. Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units; *hst-1/int-2* and *c-erbB-2/ear-1*. *Cancer Res* 1989; 49: 3104-3108.
38. VARLEY JM, BRAMMAR WJ, LANE DP et al. Loss of chromosome 17p13 sequences and mutations of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene* 1991; 6: 413-421.
39. VARLEY JM, SWALLOW JE, BRAMMAR WJ et al. Alteration to either *c-erbB-2* (neu) or *c-myc* proto-oncogenes in breast carcinoma with poor short-term prognosis. *Oncogene* 1987; 1: 423-430.

Endereço para correspondência:

Maria Aparecida Nagai
 Av. Dr. Arnaldo, 455
 Cerqueira César
 01246-903 São Paulo - SP