

Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais

Technology applied in the detection of tumor markers

Leandro Luongo de Matos*, Leandro Neves Machado*, Maurício Morita Sugiyama*,
Roberta Machado Bozzetti*, Maria Aparecida da Silva Pinhal**

Recebido: 8/10/04
Aprovado: 19/1/05

Resumo

A detecção de marcadores tumorais é de fundamental importância para o diagnóstico do estágio das neoplasias, assim como a presença de metástases e na decisão do tratamento a ser utilizado, bem como terapias adjuvantes. O objetivo deste trabalho é debater sobre alguns dos marcadores mais utilizados no diagnóstico do câncer além de discutir as técnicas usadas na sua detecção. Pode-se utilizar muito da tecnologia que a biologia molecular dispõe para a identificação e amplificação de determinado gene, pois muitos marcadores tumorais apresentam aumento da expressão por amplificação gênica, como é o caso do c-erb-B2. A identificação desses marcadores é realizada através de técnicas de RT-PCR, de imunohistoquímica, de hibridização e a de hibridização *in situ*. A hibridização para detecção de DNA, RNA ou proteínas é denominada respectivamente *Southern blot*, *Northern blot* e *Western blot*. Dado o grande número de marcadores tumorais conhecidos e as diferentes formas de detecção de cada um, é essencial que protocolos sejam padronizados internacionalmente para que tais marcadores sejam avaliados de uma maneira única.

Unitermos

Marcadores tumorais; PCR/RT-PCR; *Southern blot*; *Western blot*.

Abstract

The detection of tumor markers is so important for the diagnostic of the cancer stage, as well as the presence of metastasis and to choose the therapy and adjuvant therapy that should be used. The objective of this work is to discuss the techniques used for the detection of tumor markers, and also discuss some of the tumor markers used at cancer diagnosis. We can use molecular biology technique to identify and amplify defined gene; a lot of tumor markers present an increase of the expression due to genetic amplification, as the case of c-erb-B2. The identification of defined tumor markers using some gene expression is done by RT-PCR techniques. This RT-PCR technique is able to transform a message RNA to complementary DNA (cDNA) and this way the expression of determined tumor markers is performed by amplification

of cDNA. It is also possible to detect tumor markers by immunohistochemistry, using specific monoclonal antibodies directed to tumor proteins and the detection of the oncoproteins is performed using secondary antibodies labeled with peroxidase to detect color. In addition, there is also hybridization technology to detect DNA, RNA or protein segments using specific labels. The hybridization *in situ* by fluorescence (FISH) identify defined genetic segments at the genome of intact cells. The hybridization for detection of DNA, RNA or proteins is named *Southern Blot*, *Northern Blot* and *Western Blot*, respectively.

Keywords

Tumor markers; PCR/RT-PCR; *Southern blot*; *Western blot*.

Introdução

A proliferação, a diferenciação e a sobrevivência das células individuais em organismos multicelulares são cuidadosamente reguladas na busca das necessidades do organismo. Esta regulação é perdida nas células cancerosas que crescem e dividem-se de uma maneira descontrolada, o que pode fazer com que elas espalhem-se por todo o corpo (metástases), interferindo nas funções dos tecidos e órgãos normais. A nomenclatura dos cânceres é feita de acordo com o tecido de origem. Caso a neoplasia maligna seja derivada de tecido epitelial, é denominada carcinoma. Caso esta seja de origem mesenquimal, sua denominação é de sarcoma. Ou ainda, se advém de tecido hematopoiético, dá-se o nome de leucemia.

Na verdade, o entendimento do câncer tem sido um dos objetivos dos biólogos moleculares e celulares nos últimos anos, ou seja, não é apenas uma preocupação da área clínica. Notadamente, os estudos das células cancerosas têm esclarecido também os mecanismos que regulam o comportamento normal das células. De fato, muitas das proteínas de papel importante na sinalização celular, na regulação do ciclo celular e no controle da morte celular programada (apoptose) foram primeiramente identificadas devido a anormalidades em suas atividades que acarretam na proliferação descontrolada das células cancerosas. Assim, os estudos do câncer têm contribuído significativamente para a nossa compreensão da regulação normal das células e vice-versa.

* Acadêmicos do 4º ano de Medicina da FMABC.

** Professora Titular da Disciplina de Bioquímica da FMABC.

Detecção de marcadores tumorais

Os métodos descritos a seguir são importantes para o entendimento de como os marcadores tumorais são detectados no diagnóstico de neoplasias malignas¹.

Amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Este método é utilizado para a obtenção de grandes quantidades de um segmento da molécula de DNA, o qual foi desenvolvido por Kary Mullis em 1988. O PCR é utilizado na detecção de determinados segmentos de DNA que podem caracterizar a presença de um patógeno, como, por exemplo, um DNA viral ou parasita, ou ainda detectar um marcador tumoral. A partir de uma seqüência da molécula de DNA conhecida, a reação de PCR amplifica um segmento do DNA *in vitro*. Essencialmente, um DNA polimerase específico é usado para replicações repetidas de um segmento de DNA definido. O número de moléculas de DNA aumenta exponencialmente, dobrando a cada ciclo de replicação, de modo que uma quantidade substancial de DNA pode ser obtida de um pequeno número de cópias moldes iniciais².

O procedimento geral para a amplificação por PCR é o seguinte: o material de partida pode ser tanto um fragmento de DNA clonado ou uma mistura de moléculas de DNA – por exemplo, DNA genômico de células humanas. Uma região específica de DNA pode ser amplificada³ a partir de tal mistura, contanto que a seqüência de nucleotídeos que flanqueiam a região a ser amplificada seja conhecida, portanto, *primers* ou iniciadores específicos são essenciais para iniciar a síntese de DNA em um ponto desejado. Tais *primers* são normalmente oligonucleotídeos sintetizados quimicamente contendo de 15 a 20 bases de DNA. Dois *primers* são usados para iniciar a síntese de DNA em direções opostas a partir das fitas molde complementares de DNA. As etapas da reação de PCR estão representadas na figura 1.

Amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de RNA-mensageiro

Seqüências de RNA podem ser também amplificadas por este método se a transcriptase reversa for usada para sintetizar uma cópia de cDNA (DNA complementar), antes da amplificação por PCR. A esta técnica dá-se o nome de RT-PCR, semelhante à técnica de PCR já descrita anteriormente, entretanto nesta reação o molde inicial é uma fita de RNA mensageiro que é copiado por ação de uma enzima, a transcriptase reversa, em uma fita de DNA complementar (cDNA) e a partir dele segue-se a reação normal do DNA polimerase (PCR). A técnica de RT-PCR é sensível à degradação, necessitando de cuidados assim como o PCR. Exige, ainda, a presença de *primers* e desoxirribonucleotídeos. O *primer* deve ser complementar à seqüência a ser copiada e a extensão ocorre a partir da terminação 3' do *primer*, como na replicação do DNA. No processo de RT-PCR todos os reagentes estão em excesso, o único fator inicialmente limitante é a quantidade de cDNA nos primeiros ciclos. Amostras de RNA (entre 0,05 µg e 2,00 µg) são utilizadas^{4,5}.

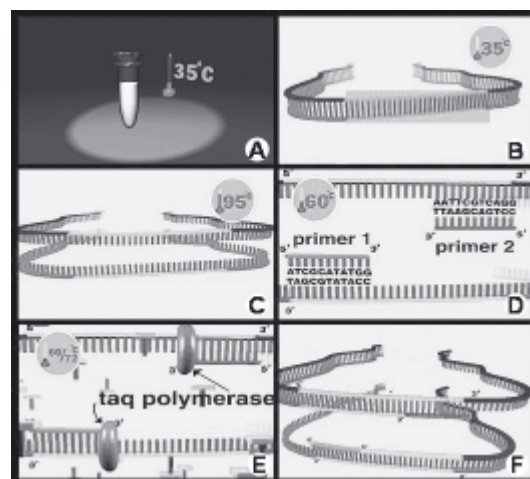


Figura 1

Etapas da reação de PCR: a reação de PCR é realizada em um tubo eppendorf colocado em um aparelho termociclador (A); seqüência específica do segmento de DNA a ser amplificado, definida pelos *primers* (B); primeira etapa da reação de PCR, determinada pela temperatura entre 94° C e 98° C que promovem a abertura da fita de DNA (C); o anelamento dos *primers* ocorre a uma temperatura entre 50° C e 60° C (D); a extensão de novos segmento de DNA ocorre a 72° C, aqui representado pela Taq DNA polimerase (E); produto final da reação de PCR após 30 a 40 ciclos (F).

O cDNA é sintetizado na presença de uma transcriptase reversa por 90 minutos a 42°C. Depois de sua síntese, o complexo cDNA–mRNA e a transcriptase reversa são desnaturados por aquecimento da mistura de reação a 94°C por dois minutos. Se não ocorrer essa desnaturação, pode haver interferência na atividade do DNA polimerase utilizado nas reações subseqüentes. Após esse processo, a fita de DNA será sintetizada e amplificada pelo mesmo processo utilizado na reação de PCR.

Detecção de seqüências específicas de ácidos nucléicos – a hibridização

A chave para a detecção de seqüências específicas de ácidos nucléicos é o pareamento de bases entre fitas complementares de RNA e DNA. Em altas temperaturas (por exemplo, 90°C a 100°C), as fitas complementares de DNA separam-se (desnaturam-se), gerando moléculas de fita simples. Se tais fitas de DNA desnaturado são então incubadas sob condições apropriadas (por exemplo, 65°C), elas vão renaturar para formar moléculas de fita dupla, de acordo com o pareamento de bases complementares – um processo chamado de hibridização de ácidos nucléicos. Híbridos de ácidos nucléicos podem ser formados entre duas fitas de DNA, duas fitas de RNA, ou uma fita de DNA e uma fita de RNA⁶.

A hibridização de ácidos nucléicos provê uma forma de detectar seqüências de DNA ou RNA que são complementares para qualquer ácido nucléico isolado, tais como um genoma viral, ou uma seqüência de DNA clonado. O segmento de DNA clonado é marcado radioativamente, em geral por ser sintetizado na presença de nucleotídeos radioativos ^{32}P . O segmento de DNA radioativo denominado sonda ou “probe” é então usado para a hibridização de seqüências de DNA e RNA homólogas, as quais são detectadas em virtude de radioatividade dos híbridos fita dupla resultantes⁷. Uma seqüência específica pode ser detectada no DNA celular total por hibridização com uma sonda de DNA radioativa. O DNA é desnaturado por aquecimento a 95°C produzindo moléculas fita simples. A sonda radioativa é então adicionada e a temperatura diminuída a 65°C, permitindo que as fitas de DNA complementar se renaturem pelo pareamento de uma com a outra. A sonda radioativa hibridiza-se com as seqüências complementares no DNA celular, as quais podem então ser detectadas como moléculas fita dupla radioativas.

Southern blotting

Trata-se da técnica desenvolvida por E. M. Southern, amplamente usada na detecção de genes específicos no DNA celular. O DNA a ser analisado é digerido por uma endonuclease de restrição e, a seguir, os fragmentos de DNA digeridos são separados por eletroforese em gel de agarose. O gel é então coberto com um filtro de nitrocelulose ou membrana de *nylon*, onde os fragmentos de DNA são transferidos para produzir uma réplica do gel. A membrana é então incubada com a sonda radioativa, que hibridiza com os fragmentos homólogos de DNA que contém a seqüência complementar. Esses fragmentos são então visualizados pela exposição do filtro a um filme de raio X. Fragmentos de DNA gerados por endonucleases de restrição são separados por eletroforese em gel. Fragmentos de DNA específicos são então identificados por hibridização com uma sonda apropriada.

Northern blotting

É uma variação da técnica de *Southern blotting* que é usado para a detecção de RNA ao invés do DNA. Neste método, os RNAs celulares totais (rRNA, tRNA, mRNA) são extraídos e fracionados de acordo com o seu tamanho por eletroforese em gel de agarose. Como no *Southern blotting* os RNAs são transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose e detectados por hibridização com uma sonda radioativa. O *Northern blotting* é freqüentemente usado para estudos de expressão gênica, visto que o mRNA é indicativo de expressão de determinada proteína – por exemplo, para determinar se RNAs específicos estão presentes em diferentes tipos de células.

Hibridização *in situ*⁸

A hibridização por ácidos nucléicos pode ser usada para detectar DNA homólogo ou seqüências de RNA presentes

não somente em extratos celulares, como descrito anteriormente, mas também em cromossomos ou células intactas – um processo chamado de hibridização *in situ*. Neste caso, a hibridização de sondas radioativas ou fluorescentes em células específicas ou estruturas subcelulares é analisada por microscopia de fluorescência. Por exemplo, sondas marcadas podem ser hibridizadas com cromossomos intactos a fim de identificar as regiões cromossômicas que contêm o gene de interesse. A hibridização *in situ* também pode ser usada para detectar mRNAs específicos em diferentes tipos de células em cortes histológicos ou em cultura de células intactas.

Identificação de proteínas específicas através de anticorpos

Estudos da expressão e função gênica requerem a detecção não somente de DNA e RNA, mas também de proteínas específicas. Para esses estudos, os anticorpos tomam o lugar de sondas de ácidos nucléicos. Tais reagentes podem agir seletivamente com moléculas protéicas únicas. Os anticorpos podem ser usados em uma variedade de maneiras para detectar proteínas nos extratos celulares. O método mais utilizado é o *imunoblotting* (também chamado de *Western blotting*)¹⁰. Trata-se de uma variação do *Southern blotting* em que as proteínas de extratos celulares são primeiramente separadas pelo tamanho por eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma vez que proteínas têm diferentes pesos moleculares e cargas elétricas, podem ser separadas. As proteínas são separadas por um método conhecido como eletroforese em gel de SDS – poliacrilamida (SDS-PAGE), no qual as proteínas são dissolvidas em uma solução contendo o detergente negativamente carregado dodecil-sulfato de sódio (SDS). Cada proteína liga-se a muitas moléculas de detergente, as quais sofrem desnaturação e assumem carga total negativa global. Nessas condições, todas as proteínas migram em direção ao eletrodo positivo, portanto, suas taxas de migração são determinadas pelo peso molecular de cada proteína. Após a eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que é então submetida a uma solução contendo anticorpos específicos contra a proteína de interesse. O anticorpo ligado à membrana pode ser detectado por vários métodos, como fluorescência ou método colorimétrico pela reação da enzima peroxidase com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), identificando, deste modo, a proteína contra a qual o anticorpo é direcionado. Resta ainda o complexo anticorpo secundário-fluorótopo e sua detecção é observada através de fluorescência quando excitado com um determinado comprimento de onda¹¹.

Principais grupos de marcadores tumorais empregados na prática clínica

O organismo humano possui alguns mecanismos para que as neoplasias não se instalem facilmente. Um dos principais sistemas de controle são os genes supressores ou antioncogenes¹². Os produtos desses genes modulam o crescimento

celular com a regulação da divisão e da diferenciação celular, com o reparo e síntese de DNA e com a indução à apoptose quando a lesão na molécula de DNA for extensa.

Alguns genes específicos chamados de proto-oncogenes codificam proteínas com função de regulação, de duplicação do DNA, na fosforilação oxidativa, no metabolismo protéico e no controle da transcrição gênica. A ativação do proto-oncogene dá-se por alterações gênicas como mutação, transcrição ou deleção, gerando os oncogenes, que contribuem fundamentalmente na formação do câncer. Essa ativação deve-se a fatores carcinogênicos como agentes físicos (raios ultravioletas), químicos (substâncias derivadas do petróleo) e/ou biológicos (vírus), fazendo com que os proto-oncogenes percam a capacidade de regulação e de controle levando à multiplicação desordenada da célula.

Com mecanismos moleculares conhecidos, a ciência médica evoluiu no entendimento das neoplasias, chegando à comprovação da existência de moléculas denominadas de marcadores tumorais.

Os marcadores tumorais são indicadores bioquímicos da presença de um tumor. Incluem antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios. Na prática clínica, entretanto, o termo refere-se genericamente a uma molécula que pode ser detectada no plasma ou em outros líquidos¹³. Os marcadores tumorais não podem ser analisados como modalidades únicas e primárias para o diagnóstico de câncer. A principal utilidade dos marcadores em medicina clínica tem sido em testes laboratoriais para apoiar o diagnóstico¹⁴. Alguns marcadores tumorais também são valiosos para determinar a resposta

ao tratamento e indicar a ocorrência de recidivas durante o período de acompanhamento.

Foram descritos numerosos marcadores tumorais, e novos aparecem a cada ano. Apenas alguns resistiram ao teste do tempo e provaram ter utilidade clínica. A aplicação de vários marcadores, relacionados na tabela 1, é considerada nas formas específicas de neoplasias de modo que os marcadores tumorais presentes adiante mostraram-se eficientes no cotidiano médico.

Marcadores tumorais tradicionais

Agrupam-se nessa categoria os marcadores estudados durante muitos anos. A associação da neoplasia relacionada com a herança genética constitui o motivo principal do estudo dos marcadores desse grupo, cujo o mais específico é o antígeno carcinoembrionário (CEA).

Trata-se de uma glicoproteína complexa, elaborada por muitas neoplasias. Dependendo do nível sérico adotado como elevação significativa, é considerado variavelmente positivo em 60% a 90% dos carcinomas colorretais, em 50% a 80% dos carcinomas pancreáticos e em 25% a 50% dos carcinomas gástricos e de mama^{16,17}. Elevações do CEA também foram relatadas em distúrbios benignos como cirrose alcoólica e doença de Crohn. Em certas ocasiões, os níveis desse antígeno estão elevados em fumantes aparentemente saudáveis. Por conseguinte, os ensaios do CEA carecem de especificidade e da sensibilidade necessárias para a detecção de cânceres no estágio inicial¹⁸. Os níveis pré-operatórios de CEA possuem algum significado para o prognóstico, visto que o nível de elevação está relacionado com a carga corporal do

Tabela 1
Marcadores tumorais selecionados¹⁵

Marcadores	Cânceres associados
<i>Hormônios</i>	
Gonadotrofina coriônica humana	Tumores trofoblásticos; tumores testiculares não-seminomatosos
Calcitonina	Carcinoma medular da tireóide
Catecolamina e metabólitos	Feocromocitoma e tumores correlatos
Hormônios ectópicos	Síndromes paraneoplásicas
<i>Antígenos oncofetais</i>	
α -fetoproteína	Câncer hepatocelular; tumores de células germinativas não-seminomatosos do testículo
Antígeno carcinoembrionário	Carcinomas do cólon, pâncreas, pulmão, estômago e mama
<i>Isoenzimas</i>	
Fosfatase ácida prostática	Câncer de próstata
Enolase neurônio-específica	Câncer de pulmão de células pequenas, neuroblastoma
<i>Proteínas específicas</i>	
Imunoglobulinas	Mieloma múltiplo e outras gamopatias
Antígeno próstata-específico	Câncer de próstata
<i>Mucinas e outras glicoproteínas</i>	
CA-125	Câncer de ovário
CA-19-9	Câncer de cólon, câncer pancreático
CA-15-3	Câncer de mama

tumor. Em paciente com câncer de cólon CEA-positivos, a presença de níveis elevados de CEA dentro de seis semanas após a terapia indica a existência de doenças residuais. A ocorrência de recidiva é indicada por um nível crescente de CEA, sendo a doença clinicamente detectável quase sempre precedida de um aumento do marcador tumoral. Os níveis séricos de CEA também são úteis para monitorizar o tratamento de câncer de mama metastático^{19,20}.

Marcadores que expressam os oncogenes e genes supressores de tumor

Ao contrário dos marcadores tradicionais, os desse grupo são potencialmente associados a fenômenos biológicos que têm uma relação bem conhecida com o desenvolvimento da neoplasia²¹.

O proto-oncogene *c-erbB-2* é amplificado e hiperexpresso em 20% a 40% dos carcinomas primários de mama. Essa categoria está associada a um pior prognóstico. O *c-erbB-2* pertence a uma família de receptores de membrana cujo domínio extracelular pode ser identificado, dosado em cultura ou liberado na circulação²².

Além de marcadores de recidiva, a proteína associada ao *c-erbB-2* foi também avaliada como um possível parâmetro preditivo da resposta ao tratamento. Foi discutido que a hiperexpressão do *c-erbB-2* no tecido está associada a uma pequena probabilidade de resposta ao tratamento hormonal ou à quimioterapia.

A molécula ErbB2 pertence a uma família de receptores de membrana com atividade de tirosina quinase que reconhecem peptídeos relacionados ao fator de crescimento epitelial (EGF). Os membros da família, além do próprio ErbB2, são: EGFR, o receptor de EGF (também designado ErbB1 ou HER1); ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Todos os ErbBs apresentam um domínio extracelular onde se encontra o sítio de ligação a fatores de crescimento²³, um único domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático, onde se encontra o sítio catalítico de tirosina quinase.

Vários ligantes têm sido descritos para esta família de receptores, porém até o momento não foi possível demonstrar a interação de qualquer uma dessas moléculas com ErbB2, para o qual não foi identificado nenhum ligante. No processo de sinalização intracelular mediado por membros da família ErbB, o primeiro evento após a interação do receptor com seu ligante específico é a dimerização (ou possivelmente oligomerização) de receptores ativados. Esta dimerização ocorre mais frequentemente entre diferentes membros da família, mas também pode ser homóloga. Em seguida, a atividade de tirosina quinase do receptor é estimulada e há fosforilação de resíduos de tirosina específicos localizados nos domínios intracelulares da própria proteína, em uma região próxima ao carboxiterminal. Tais alterações criam sítios ativos para o acoplamento de fatores adaptadores que finalmente desencadeiam a ativação de diversas vias de sinalização envolvendo controle da divisão celular e regulação da expressão de vários genes²⁴.

Anticorpos circulantes contra antígenos tumorais

Nas neoplasias malignas encontramos, com frequência, moléculas caracterizadas por uma expressão muito mais acentuada do que no tecido sadio, ou por alterações qualitativas relacionadas a espécies análogas de moléculas normais. Essas características favorecem uma resposta imune do organismo hospedeiro que pode gerar anticorpos específicos contra antígenos-tumor associados, sendo os principais: anti-p-53 e anti-*c-erbB-2*.

A seguir apresenta-se uma reação imunoistoquímica que identifica a oncoproteína ErbB2 em um tumor de cérvix (Figura 2). Tal oncoproteína foi identificada utilizando-se um anticorpo específico.

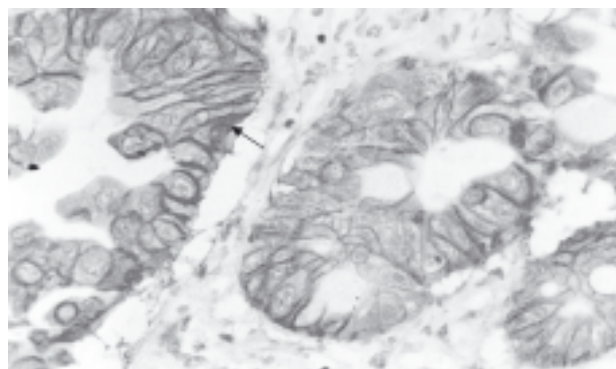


Figura 2
Anticorpo anti-ErbB2 (seta) identificando superexpressão desta oncoproteína na superfície celular neoplásica em um tumor maligno de cérvix; reação imunoistoquímica LSAB-peroxidase 400 x (foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ismael Guerreiro)

Proteína ras

O *ras* é um oncogene que faz parte de um grupo de proto-oncoproteínas citoplasmáticas transdutoras de sinal cuja detecção é feita pelo PCR (reação em cadeia da polimerase). Trata-se de uma família de proteínas de ligação guanina-trifosfato. Foram descobertas na forma de oncogenes virais. Cerca de 10% a 30% de todos os tumores humanos contém versões de mutações das proteínas *ras*²⁵.

Estudos indicam que sua função é participar na mitogênese de fatores de crescimento. As proteínas *ras* normais estão fixadas na parte interna da membrana citoplasmática, alternando entre uma forma ativada (que transmite sinais) e um estado inativo.

Quando uma célula normal é estimulada através de um receptor de fator de crescimento, *ras* inativo (ligado a GDP) é ativado ao ligar-se ao GTP²⁶. O *ras* ativo recruta o *raf-1* (proteína citosólica), estimulando a via da MAP-quinase (proteína quinase ativada por mitógeno) para transmitir

sinais promotores de crescimento ao núcleo. O processo é regulado por GTPase intrínseca à *ras*, tendo sua ação acelerada pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAPs). Esta converte GTP a GDP, terminando a transdução de sinal e controlando a atividade da *ras*^{27,28}.

Alguns estudos têm sido feitos na tentativa de controlar a atividade da *ras* ativada; esta está ancorada à membrana através de um grupo lipídico isoprenil facilitado pela enzima farnesiltransferase. São utilizados inibidores desta enzima para afetar a *ras* ao impedirem sua localização normal²⁹.

Proteína p53

Identificada inicialmente em 1978, a proteína p53 é composta por 393 aminoácidos e seu nome deriva de seu peso molecular que é de 53 kDa. É formada a partir da codificação contida no gene p53 situado no braço curto do cromossomo 17³⁰.

Para demonstrar a sua importância, pode-se citar o fato de que mutações na p53 são encontradas em cerca de 50% de todos os cânceres humanos, ou mais de 50 tipos de tumores³¹.

Para entender o funcionamento da proteína p53, são fundamentais algumas considerações sobre o ciclo celular³². Após um período inicial de repouso (G1), a célula entra em uma fase de síntese de DNA (S) durante a qual ocorre o processo de duplicação de seu conjunto de 23 pares de cromossomos, passando a um número de 46, visando uma posterior divisão que originará duas células filhas com a mesma característica genética. Entretanto, antes que esta divisão ocorra, a célula entra em um novo período de repouso, chamado de fase G2 cujo objetivo é preparar a célula para a mitose. Nessa preparação, há uma etapa fundamental correspondente à verificação geral do DNA duplicado, a fim de detectar eventuais problemas ocorridos

durante a duplicação devida, por exemplo, a drogas, radiação ou falhas no próprio mecanismo de divisão.

Essas alterações cromossômicas, uma vez transmitidas às células filhas, poderão resultar em conseqüências indesejáveis como neoplasias³³.

Assim, torna-se essencial a existência de mecanismos capazes de detectar a ocorrência dos defeitos e das mutações cromossômicas, e também impedir a transmissão errônea para as gerações celulares subseqüentes, como a proteína p53³⁴.

Conclusão

De todo o levantamento bibliográfico realizado, pôde-se concluir que o *screening* de marcadores tumorais é de fundamental importância no diagnóstico do estágio da doença, assim como a presença de metástases e a decisão da terapia a ser utilizada, bem como terapias adjuvantes.

Células em frequências bastante baixas podem ser detectadas, utilizando anticorpos monoclonais direcionados a citoqueratinas características de células epiteliais metastáticas ou marcadores tumorais como receptores de fatores de crescimento (ErbB2) e outras moléculas marcadoras de células tumorais metastáticas, importantes para o monitoramento da eficiência de terapias adjuvantes que são utilizadas no tratamento. Tal detecção pode representar um prognóstico importante no desenvolvimento da doença.

Entretanto, dado o grande número de marcadores tumorais conhecidos e as diferentes formas de detecção de cada um com suas variáveis, é essencial que protocolos sejam padronizados internacionalmente para que tais marcadores sejam avaliados sem diferentes variações e possam seguir um protocolo único de detecção. Por exemplo, um mesmo marcador de metástase pode refletir diferentes prognósticos se estudos forem realizados por imunistoquímica utilizando diferentes anticorpos.

Referências bibliográficas

1. Sklar JL, Costa JC. Principles of cancer management: molecular pathology. In: DeVita VT et al (editors). Cancer: principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven: 1997, p. 259.
2. Yamaguchi K et al. Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. *Am J Gastroenterol* 1997;92:307-12.
3. Chang C, Meyerowitz EM. Plant genome studies: restriction fragment length polymorphism and chromosome mapping information. *Curr Opin Genet Dev* 1991;1:112-8.
4. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hibridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5350-4.
5. Berk AJ, Sharp PA. Sizing and mapping of early adenovirus mRNA by gel electrophoresis of S1 endonuclear digested hybrids. *Cell* 1977;12:721-32.
6. Grunstein M, Hogness DS. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1975;72: 3961-5.
7. Lathe R. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J Mol Biol* 1985;183:1-12.
8. Trask BJ. Gene mapping by in situ hybridization. *Curr Opin Genet Dev* 1991;1:82-7.
9. Koshinen PJ, Alitalo K. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation, and death. *Semin Cancer Biol* 1993;4:3.
10. Broone S, Gilbert W. Immunological screening method to detect specific translation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:2746-9.
11. Harlow E, Lane D. Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Laboratory Press: 1999.
12. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Philadelphia: Editora Guanabara Koogan: 2000.

13. Pamies RJ, Crawford DR. Tumor markers: DNA update. *Med Clin North Am* 1996;80:185.
14. Hayes DF, Bast RC et al. Tumor marker utility grading system: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Nat Cancer Inst* 1996;88:1456-66.
15. Baynes J, Dominiczak MH. *Bioquímica médica*. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole; 2000.
16. ASCO (American Society of Clinical Oncology). 1997 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:793-5.
17. ASCO (American Society of Clinical Oncology). Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1994;10:2843-77.
18. Canevari S, Pupa SM et al. 1975-1995 Revised anti-cancer serological response: biological significance and clinical implications. *Ann Oncol* 1997;7:227-32.
19. Von Kleist S. Molecular biology of the carcinoembryonic antigen. In: Ballesta A, Torre GC et al. *Up dating on tumor markers in tissue and in biological fluids*. Minerva Medica, Torino: 1997.
20. Veronesi U, Luini A, Costa A, Andreoli C. *Mastologia oncológica*. 1ª ed. Milão: Editora Medsi; 2002.
21. Lin S-CJ. Gene in the Rb pathway and their knockout in mice. *Semin Cancer Biol* 1996;7:279.
22. Gusterson BA, Gelber RD et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-56.
23. Salomon DS et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Ver Hematol Oncol* 1995;19:183.
24. Muss HB, Thor A et al. c-erbB-2 expression and S-phase activity predict response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1260-6.
25. deVries JE et al. p21ras in carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 1996;192:658.
26. Waldmann V, Robes HM. What's new in Ras genes? *Pathol Res Pract* 1996;192:883.
27. Leone G et al. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/cdk2 and E2F. *Nature* 1997;387:422.
28. Baringa M. News. From benchtop to bedside. *Science* 1997;278:1036.
29. Sanchez-Garcia I, Martin-Zonca D. Regulation of bcl-2 gene expression by bcr-c-abl is mediated by ras. *J Mol Biol* 1997;267:225.
30. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323.
31. Graeber AJ et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 1996;379:88.
32. Scherr CJ. Cancer cell cycle. *Science* 1996;274:1672.
33. Oren M. Lonely no more: p53 finds its kin in a tumor-suppressor haven. *Cell* 1997;90:829.
34. Somasundaram K et al. Arrest of the cell cycle by the tumor-suppressor BRCA-1 requires the CDK inhibitor p21WAF-1/Cip1. *Nature* 1997;389:187.

Endereço para correspondência

Faculdade de Medicina do ABC
 Leandro Luongo de Matos
 Rua Nova Pátria, 104
 Tel.: 5058-8988
 E-mail: lmatos@amcham.com.br