

DIAGNÓSTICO DE PRECISÃO

1. Introdução à Medicina de Precisão
2. Genética molecular do câncer
3. Importância dos cuidados pré-analíticos para exames moleculares
4. Ferramentas utilizadas na Medicina de Precisão
5. Sequenciamento de Nova Geração (NGS): Era Pós-Genômica
6. O uso da Bioinformática na análise de NGS
7. *Tumor Mutational Burden* (TMB) na predição de resposta à imunoterapia
8. A biópsia líquida na prática oncológica

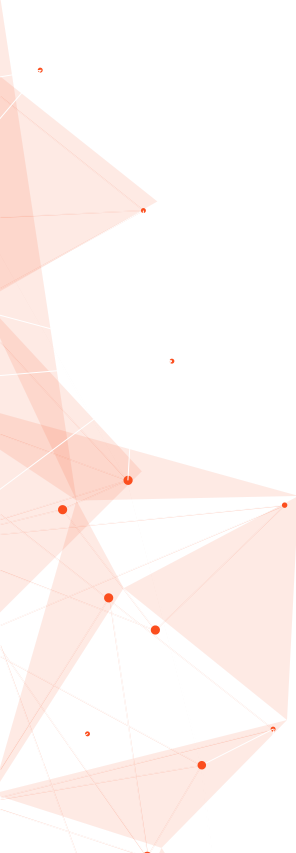
COLABORADORES

Coordenador



Dr. Mariano Zalis

Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento da OC Precision Medicine – Grupo Oncoclínicas; professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); doutor em Biofísica/Biologia Molecular; mestrado em Imunologia



Professores



Dr.ª. Carolina de Bustamante

Especialista em Genética Molecular na OC Precision Medicine – Grupo Oncoclínicas; mestrado e doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Dr.ª. Layla Galindo

Gerente de laboratório – Oncoclínicas Precision Medicine; graduação em Ciências Biológicas, na modalidade Médica, pela Universidade Estadual Paulista (Unesp); especialização em Biologia Molecular; mestrado pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp); doutorado pela Unifesp



Dr.ª. Maíra Cristina Menezes Freire

Coordenadora de Medicina Personalizada do Grupo Pardini e Assessora do Laboratório Progenética/Grupo Pardini; graduação em Ciências Biológicas; mestrado e doutorado em Genética pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo parte do doutorado realizado na Universidade de Missouri (EUA); pós-doutorado em Genética Humana e Médica pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); pós-graduação em Aconselhamento Genético para Predisposição ao Câncer Hereditário, no Hospital Albert Einstein



Diagnóstico de Precisão

Capítulo 1

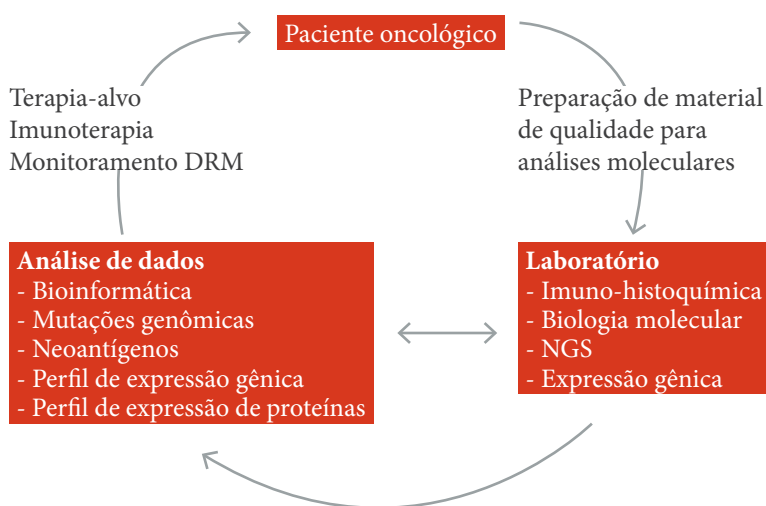
Introdução à Medicina de Precisão

A Medicina de Precisão pode ser definida como o uso das informações genéticas, epigenéticas, da exposição ambiental e outros dados para definir padrões individuais de características do indivíduo e das doenças. Essa nova abordagem permite a segregação de pacientes com uma doença específica em subgrupos, baseado em suas características genótípicas e fenotípicas. Dessa forma, a Medicina de Precisão possibilita a melhor resposta para um medicamento em particular ou o risco diminuído de efeitos secundários, podendo assim direcionar cada paciente ao tratamento mais adequado¹.

A descoberta de novos tratamentos para doenças humanas sempre inclui fases de ensaios clínicos, durante os quais, em uma das etapas finais, os indivíduos afetados pela doença passam pelo tratamento testado. Embora o desenho e a implementação desses ensaios tenham se tornado cada vez mais precisos ao longo da história, há uma variabilidade na resposta entre indivíduos que não pode ser explicada apenas por variações na idade, na nutrição, no ambiente ou de outros fatores comumente analisados. A busca de respostas para justificar a ineficácia, os efeitos adversos ou o óbito em certos indivíduos avançou à medida que os estudos do genoma humano progrediam. A resposta, ao que parece, está nas variabilidades individuais dos genes e da expressão gênica.

A Oncologia de Precisão, um braço da Medicina de Precisão, é definida pelos estudos de perfis moleculares de tumores para identificar alterações genômicas que podem direcionar um tratamento do câncer individualizado. Ela está se tornando rapidamente uma prática habitual na Oncologia Clínica (figura 1).

Figura 1. Fluxo e aplicações da Medicina de Precisão em Oncologia



Os testes genômicos na Oncologia de Precisão envolvem profissionais como oncologistas, patologistas, biólogos moleculares e bioinformatas, que trabalham de forma coordenada para fornecer amostras de tecido de alta qualidade para laboratórios tecnicamente preparados, onde a análise molecular apropriada leva a resultados precisos para uma indicação personalizada do tratamento. Atualmente, os médicos oncologistas devem estar familiarizados com os tipos de variantes genômicas relatadas pelo laboratório e às tecnologias utilizadas para determinar os resultados, incluindo limitações das metodologias e relatórios de testes atuais. A interpretação dos resultados genômicos é mais bem realizada por grupos multidisciplinares, com o auxílio de ferramentas de Bioinformática validadas para produzir relatórios precisos e, assim, reduzir a incerteza nas recomendações clínicas relacionadas a uma variante identificada².

O valor do perfil molecular previne tanto a subutilização de terapias-alvo de variantes bem documentadas, quanto a superutilização da terapia sem benefício comprovado. À medida que as técnicas moleculares evoluem e se tornam economicamente acessíveis, o uso de testes moleculares pode adicionar mais especificidade e melhorar os resultados para um número maior de pacientes³.

Pontos-chave

- A Oncologia de Precisão começou a ser praticada a partir do conhecimento do genoma do câncer por meio de testes moleculares, incluindo o sequenciamento de nova geração (NGS);
- Oncologistas devem estar familiarizados com aspectos técnicos dos testes moleculares, para facilitar a seleção do exame a ser realizado e a interpretação dos resultados fornecidos;
- Considerações para testes moleculares incluem: qual tipo de tecido utilizar; tempo de perfil no curso da doença; extensão do painel para encomendar; e grau de anotação clínica relatado;
- A interpretação de dados moleculares para facilitar as melhores práticas continua sendo um desafio. A participação em ensaios clínicos e o compartilhamento de conjuntos de dados moleculares ou clínicos vinculados são fortemente incentivados.



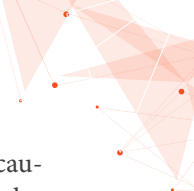
REFERÊNCIAS

1. Marchiano RM, Di Sante G, Piro G et al. Translational research in the era of Precision Medicine: where we are and where we will go. *J Pers Med*. 2021 Mar 18;11(3):216.
2. Rodriguez H, Zenklusen JC, Staudt LM et al. The next horizon in Precision Oncology: proteogenomics to inform cancer diagnosis and treatment. *Cell*. 2021 Apr 1;184(7):1661-70.
3. Advani D, Sharma S, Kumari S et al. Precision Oncology, signaling and anticancer agents in cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem*. 2022;22(3):433-68.

Diagnóstico de Precisão

Capítulo 2

Genética molecular do câncer



O câncer é uma doença genética, ou seja, todos os tipos de câncer são causados por alterações nos genes que controlam a forma como nossas células funcionam, especialmente como elas crescem, se dividem e sobrevivem. Os genes carregam as informações para sintetizar as proteínas que são essenciais para a estrutura e para o metabolismo das nossas células. Alterações genéticas podem fazer com que as células modifiquem os mecanismos normais de controle de crescimento e desenvolvam um câncer. Por exemplo: variantes genéticas adquiridas em receptores de crescimento celular (como EGFR e HER-2) e de ativação celular (como KRAS, NRAS e BRAF) aumentam a ativação de proteínas das vias metabólicas relacionadas com a ativação e com a sobrevivência celular, tornando-a uma célula tumoral. Já alterações em outro grupo de genes que normalmente tem a função de reparo de DNA (como BRCA-1, BRCA-2 e MLH1) e de supressão tumoral (TP53) resultam na produção de proteínas de forma disforme e, portanto, não funcionais¹.

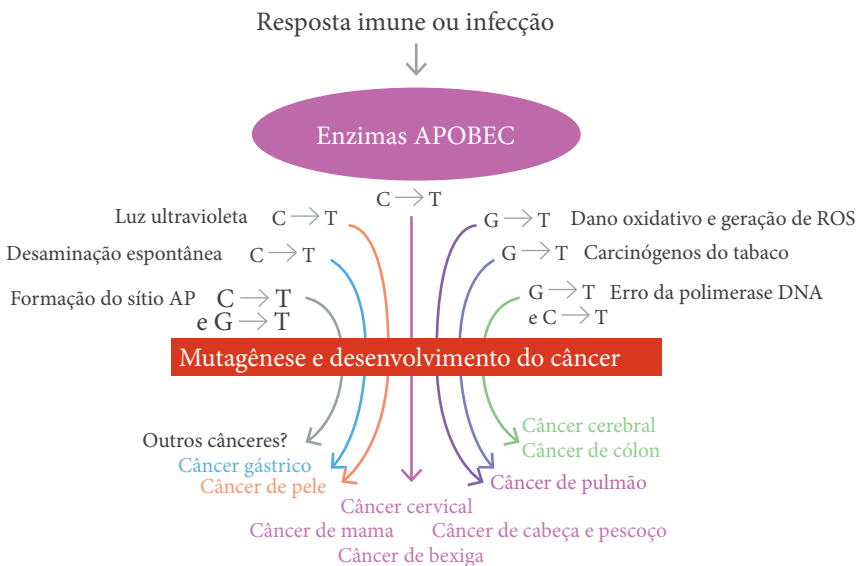
Alterações genéticas que aumentam o risco de câncer podem ser herdadas de nossos pais, caso essas alterações estejam presentes nas células germinativas, aumentando muito o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Tais alterações, chamadas de variantes germinativas, estão presentes em todas as células do indivíduo e podem ser transmitidas para outras gerações, causando o câncer hereditário. As variantes germinativas são identificadas em cerca de 5% a 10% de todos os cânceres. Pesquisadores associaram variantes em genes específicos com mais de 50 síndromes de câncer hereditário.

Essas variantes ocorrem em genes protetores, que regulam diretamente o ciclo celular (como TP53, RB1 e APC) e genes de manutenção, que atuam reparando danos no DNA (como BRCA-1, BRCA-2, MLH1, MSH2 e PMSL1), mantendo assim a integridade genômica e evitando a instabilidade genética. Essas alterações sozinhas não induzem a formação de neoplasia, pois alterações nesses genes não conferem vantagens proliferativas à célula, mas facilitam a ocorrência de outras variantes que darão início à carcinogênese. No entanto, algumas famílias podem possuir mais de um indivíduo com o mesmo tipo de câncer sem associação com variantes genéticas herdadas, mas, sim, devido ao estilo de vida compartilhado, como o uso de tabaco, por exemplo. Ainda assim, certos padrões em uma família podem ajudar a sugerir a presença de uma síndrome de câncer hereditário, como os tipos de câncer que desenvolvem, outras condições não cancerígenas que são identificadas e a idade em que o câncer se manifesta².

Por outro lado, as alterações genéticas causadoras do câncer esporádico, ou seja, câncer não hereditário, são adquiridas ao longo da vida como resultado de erros no nosso genoma que surgem à medida que as células se dividem. Essas alterações ocorrem devido à exposição a substâncias cancerígenas que danificam o DNA, como produtos químicos do tabaco, radiação ionizante, raio ultravioleta do sol e até infecções virais. Essas alterações genéticas que ocorrem de

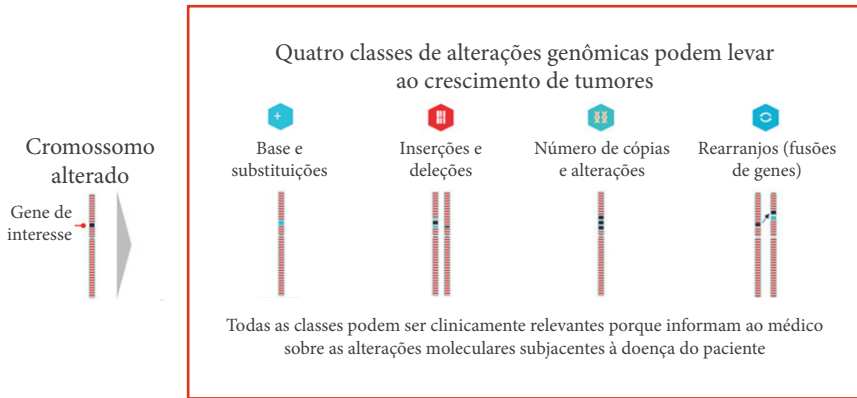
forma não hereditária são chamadas de alterações somáticas (ou adquiridas). Na literatura, essas variantes somáticas podem ser do tipo *passenger mutation*, isto é, variantes que não estão envolvidas com a oncogênese e não conferem vantagem no crescimento clonal das células tumorais. Por outro lado, as *driver mutations* são as variantes envolvidas com a oncogênese e que conferem a vantagem no crescimento e na sobrevivência clonal das células tumorais (figura 2)³.

Figura 2. As trocas específicas de nucleotídeos de um genoma podem estar vinculadas às diferentes exposições de agentes químicos, infecções, raio ultravioleta e por erros causados na replicação do DNA



Existem diversos tipos de variantes genéticas que podem ocorrer no DNA. Algumas alterações afetam apenas o nucleotídeo: são os SNPs (*single nucleotide polymorphism*), no qual um nucleotídeo pode ser substituído por outro, o que pode ou não modificar as estruturas físico-químicas e funcionais de uma proteína. Outras alterações podem envolver pequenas deleções e inserções de DNA, as *indels*; ou ainda as modificações no DNA que incluem rearranjos (fusões gênicas) e grandes deleções ou duplicações de longos trechos de DNA, aumentando ou diminuindo o número de cópias gênicas (CNVs) (figura 3).

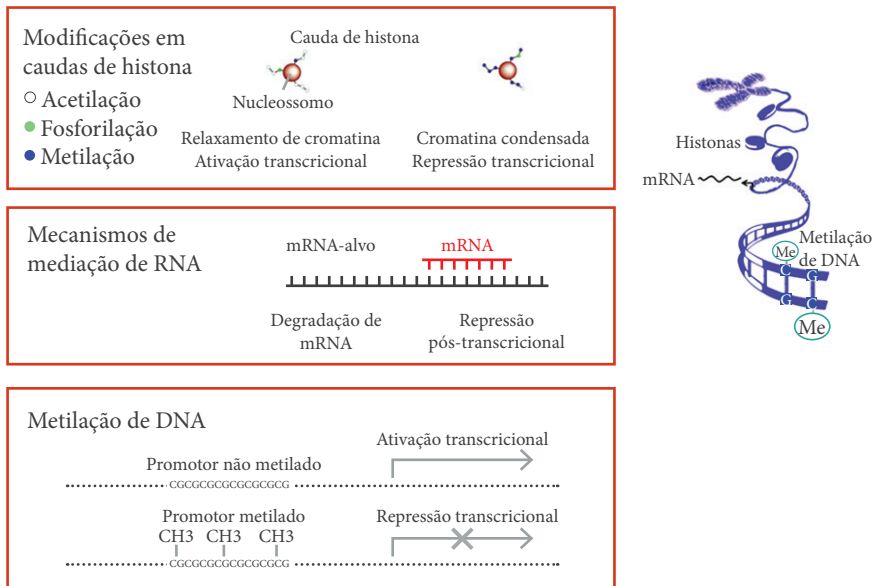
Figura 3. Diferentes tipos de alterações encontradas no DNA de uma célula tumoral



Em alguns casos, as alterações não ocorrem somente na sequência de DNA. A adição ou remoção de marcas químicas (como metilações e acetilações), chamadas modificações epigenéticas no DNA, por exemplo, podem influenciar a expressão gênica e a produção de proteínas essenciais para a proliferação celular⁴. Essas modificações epigenéticas têm como consequência a diminuição da expressão de genes importantes na supressão tumoral e no reparo do DNA, entre outras funções.

Entre os outros fatores epigenéticos, podemos destacar o controle gênico por miRNA (microRNA). Os miRNA são pequenas moléculas RNAs sem codificação, que regulam a expressão genética pós-transcricional. Esses miRNA geralmente ligam-se às regiões 3'-UTR (região não traduzida) de seus mRNAs-alvo e reprimem a produção de proteínas, desestabilizando o mRNA e o silenciamento de expressão de proteínas essenciais no controle celular (figura 4)⁵.

Figura 4. Mecanismos epigenéticos: (a) modificações das histonas por acetilação, fosforilação e metilação; (b) interferência na tradução do mRNA por miRNA; (c) metilação e demetilação em promotores de genes

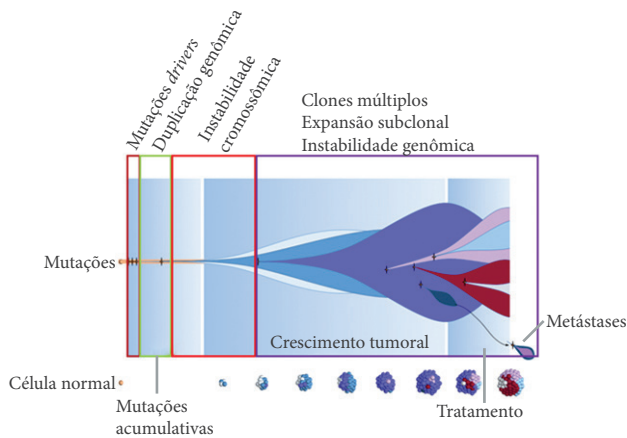


Heterogeneidade intratumoral

Vários processos mutacionais e de instabilidade cromossômica ocorrem durante o crescimento de um tumor e fazem com que, a partir de um único clone celular, desenvolva-se um tumor temporal e espacialmente heterogêneo. A quimioterapia e a radioterapia durante o tratamento do câncer podem igualmente criar uma instabilidade genômica, aumentando o espectro mutacional do tumor⁶.

A diversidade genômica dentro de tumores é um fator muito importante na etiologia e na progressão de um determinado tumor. Com o desenvolvimento de técnicas de microdissecção de cortes histopatológicos e do sequenciamento de grandes painéis gênicos pela técnica de NGS, a compreensão da heterogeneidade intratumoral (HIT) genômica está se tornando cada vez mais aparente. O sequenciamento genômico de células de regiões tumorais espacial e temporalmente distintas começou a desvendar a extensão da diversidade dentro dos tumores (figura 5).

Figura 5. Evolução da heterogeneidade tumoral



Estudos revelam que o grau de HIT pode ser altamente variável, já tendo sido identificadas mais de 8 mil variantes dentro de tumores primários, entre locais primários e metastáticos, ou de recidiva. Apesar das ressalvas quanto às diferenças no procedimento amostral, estágio tumoral e profundidade de sequenciamento, é evidente que certos tipos de tumores, como melanoma e câncer de pulmão, abrigam uma carga mutacional de codificação homogênea significativamente maior do que outros tipos de câncer.

Dessa forma, alterações em oncogenes que tornam os genes constitutivamente ativos são consideradas variantes patogênicas ou alterações *driver* e são pontos de controle centrais para a progressão de malignidades. Por outro lado, os genes supressores tumorais, envolvidos naturalmente no controle da patogênese tumoral, podem causar a progressão do câncer quando inativados por meio de variantes pontuais, metilação do DNA ou perda de alelo em um loco heterozigoto (LOH). Múltiplos processos resultam na desregulação do maquinário genético no DNA, RNA ou proteína, levando à expressão alterada da proteína codificada pelo gene. Para capturar todo o espectro de alterações potenciais, múltiplas tecnologias devem ser consideradas, denominadas de abordagem multi ou *pan-omics*. O grande número de opções de tecnologias, entidades comerciais que oferecem testes e, por vezes, resultados conflitantes tem sobrecarregado os médicos que procuram obter informações moleculares que resultarão em utilidade clínica para seus pacientes.



REFERÊNCIAS

1. Martínez-Jiménez F, Muiños F, Sentís I et al. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(10):555-72.
2. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. 2016;354(6312):618-22.
3. ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 2020;578(7793):82-93.
4. Rodríguez-Casanova A, Costa-Fraga N, Bao-Caamano A et al. Epigenetic landscape of liquid biopsy in colorectal cancer. *Front cell Dev Biol*. 2021;9:622459.
5. PCAWG Transcriptome Core Group; Calabrese C, Davidson NR, Demircioğlu D et al. Genomic basis for RNA alterations in cancer. *Nature*. 2020;578(7793):129-36.
6. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016;534(7605):47-54.

Capítulo 3

**Importância
dos cuidados
pré-analíticos
para exames
moleculares**

Com o aumento da sensibilidade dos testes moleculares, cada vez é necessária uma menor quantidade de DNA e de RNA para o processamento das análises. Entretanto, a exigência da qualidade dessa amostra biológica aumenta. A qualidade da amostra biológica a ser submetida a um teste molecular reflete diretamente na acurácia do resultado final. Por isso, a integridade da amostra deve ser mantida durante todas as etapas dos processos, desde aquisição da amostra e transporte até o processamento e armazenamento. Estima-se que de 60% a 70% dos problemas encontrados com os resultados obtidos no laboratório são devido a fatores pré-analíticos. A fase pré-analítica é caracterizada por todos os processos em que as amostras são submetidas antes de serem recebidas no laboratório de genômica¹.

Em 2019, Compton *et al*² publicaram um consolidado de recomendações para o tratamento pré-analítico de amostras de biópsias fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFPE – *formalin fixed paraffin embedded*) e de amostras de sangue. O estudo foi elaborado pelo grupo Precision Medicine Project Team do College of American Pathologists (CAP) com base nas recomendações publicadas por American Society of Clinical Oncology (ASCO), Biorepositories and Biospecimen Research Branch, European Committee for Standardization/ Technical Committee e CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). Nesse estudo, foi elencada uma lista de seis fatores pré-analíticos para tecido e sangue de forma que a integridade das amostras seja preservada.

Recomendações de fatores pré-analíticos para manutenção da qualidade de ácidos nucleicos em amostras de tecido em FFPE

- **Tempo para estabilização:** tempo entre a coleta da amostra e a fixação deve ser de menos de uma hora;
- **Método de estabilização:** a fixação deve ser realizada em formalina tamponada a 10% pH 7. O tempo de fixação varia de acordo com o tipo de tecido, sendo no mínimo por seis horas e no máximo 36 horas. Porém, tecidos ricos em gordura, como mama, por exemplo, podem levar até 48 horas para a fixação adequada. Descalcificação ácida não é indicada ser realizada em tecidos em que será feita análise molecular;
- **Espessura da amostra:** máximo de 5mm são recomendados para que haja penetração completa e uniforme da formalina no tecido. Da mesma forma, a proporção de volume de formalina por massa de tecido deve ser, em geral, de 4:1;
- Manter a qualidade e pureza da formalina utilizada, assim como da água, banhos e parafina. A parafina deve ser *low-melt* (< 60°C);
- Manter condições adequadas de armazenamento, em local limpo e temperatura entre 18°C e 25°C;
- Manter documentados todos os processos em que as amostras são submetidas.

Recomendações de fatores pré-analíticos para manutenção da qualidade de ácidos nucleicos em amostras de sangue, soro e plasma

- Tempo entre coleta e processamento da amostra: em até 48 horas, caso o tubo de coleta tenha solução estabilizadora;
- Coletar as amostras em tubo específico de acordo com o processo a ser realizado. No caso de testes moleculares, a coleta deve ser realizada em tubo contendo EDTA;
- Completar o volume do tubo e fazer ao menos dez inversões para garantir completo contato entre o sangue e a solução estabilizadora;
- Caso haja necessidade de centrifugação, utilizar tempo e velocidade validados para cada tipo de amostra. Manter a temperatura indicada para cada protocolo;
- Não realizar mais de um ciclo de congelamento e descongelamento de plasma e soro;
- Manter documentado todos os processos em que as amostras são submetidas.

Sabe-se que os parâmetros pré-analíticos podem ser customizados conforme a necessidade. Para a análise de DNA tumoral circulante ou biópsia líquida, o fator pré-analítico também é de extrema importância e requer treinamento de todos os envolvidos.

REFERÊNCIA

1. Sotoudeh Anvari M, Gharib A, Abolhasani M et al. Pre-analytical practices in the molecular diagnostic tests: a concise review. Iran J Pathol. 2021;16(1):1-19.

Veja esse conteúdo na íntegra
acessando a OC Academia:

<http://ocacademia.com>

