6 AVANÇOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO: BIOLOGIA MOLECULAR

Teresa Yae Takagaki

Doutora em Pneumologia pela Faculdade de Medicina da USP
Médica Supervisora do Serviço de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Biologia molecular em câncer de pulmão

Todas as modalidades terapêuticas para câncer tem sido utilizados em carcinoma pulmonar no decorrer de décadas, na tentativa de melhorar os resultados de sobrevida, mas continua a ser de 15 a 75% em 5 anos, mesmo naqueles pacientes considerados curados, após ressecção cirúrgica.

O estudo da biologia molecular do câncer de pulmão vêm obtendo resultados satisfatórios, com a descoberta de diversos mecanismos e substâncias envolvidas na gênese e no comportamento biológico desta neoplasia, permitindo a análise da sua relação com as características clínicas, para melhorar os resultados atuais.

A descoberta de que o câncer pode ser causado por alteração no material genético das células, levando a alteração na expressão dos genes, pelas observações como predisposição hereditária para o câncer, a presença de cromossomos danificados nas células tumorais, e a descoberta de genes celulares (protooncogenes) que, quando mutados, estimulam o crescimento tumoral, tem conduzido a tentativa de desenvolver novas estratégias terapêuticas dirigidas para interromper o crescimento de células tumorais. Tratamento utilizando anticorpos monoclonais, inibidores de matriz de metaloproteinases, alteração e transferência de genes estão sendo investigados.

Fatores de crescimento em câncer pulmonar

No final dos anos 70, Sporn e Todaro (1)postularam que a patogênese e progressão de muitos dos tumores sólidos, incluindo carcinoma pulmonar, são conduzidas por fatores de crescimento parácrino e autócrino locais.

Estudos subsequentes identificaram fatores de crescimento epidérmico(EGF) em muitos carcinomas de células não pequenas, especialmente aqueles de histologia escamosa. Acredita-se que EGF esteja envolvido na patogênese do câncer pulmonar, como está evidente na superexpressão do receptor EGF na maioria das displasias, incluindo carcinoma de células escamosas pulmonar (2). Há várias maneiras para interromper esta via, incluindo uso de anticorpo monoclonal para EGF e receptor de EGF, imunotoxinas recombinantes, inibidores específicos de tirosina quinase, que previnem ativação de EGF, e imunotoxinas dirigidas ao receptor. Outros receptores de tirosina quinase da família EGF também estão superexpressos em carcinoma de células não pequenas, e estão sendo examinados como potenciais marcadores prognósticos e terapêuticos. O anticorpo monoclonal contra o receptor do fator de crescimento epidérmico pode inibir o crescimento de células do pulmão neoplásicas. Um ensaio clínico com anticorpos contra o fator de crescimento epidérmico está em andamento, para deter-

minar se o bloqueio da ligação entre o fator de crescimento epidérmico com seu receptor inibe de fato o crescimento do tumor.

O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor transmembrana do fator de crescimento epidérmico ou para o fator de crescimento transformado. EGFR é superexpresso em cerca de 45% de carcinoma de células não pequenas. Pode ser inativado pela ligação de seus domínios extra-celulares pelos anticorpos monoclonais, ou pela inibição de sua tirosina quinase intracelularmente. C225 (Cetuximab) é um anticorpo monoclonal humanizado contra EGFR que tem sido já testado em homem. ZD 1839 (Iressa) é um inibidor do receptor de tirosina quinase que está sob avaliação atual, sozinho ou em associação com drogas citotóxicas padrão, para pacientes com carcinoma de células não pequenas (2).

A identificação dos hormônios que estimulam a proliferação celular, produzidas pelas células cancerosas dos tumores de pulmão, tem levado ao desenvolvimento de esforços na tentativa de inibir o crescimento de tumores pelo bloqueio de resposta a esses hormônios de peptídeos. O peptídeo mais amplamente estudado é o peptídeo liberador de gastrina (GRP), um análogo em mamíferos do hormônio de anfíbios, denominado bombesina. O GRP é produzido pelas células do carcinoma de pequenas células do pulmão, que tem receptores de superfície para o peptídeo. Ele estimula o crescimento do carcinoma de pequenas células tanto in vitro como in vivo em camundongos glabro. Um anticorpo monoclonal murino antibombesina, dirigida contra o GRP, inibe o crescimento do carcinoma de células pequenas e está sendo atualmente usado em ensaios clínicos (3). Outros peptídeos produzidos ectopicamente pelas células cancerosas dos tumores do pulmão, e que agem como fatores de crescimento, incluem: a arginina vasopressina, bradicinina, colecistoquinina, e outros, são fatores de crescimento para quase todos os carcinomas de células pequenas, e alguns carcinomas de células grandes e adenocarcinoma. Fator de crescimento insulinóide I e fator de crescimento de nervo tem sido descritos ser fator de crescimento para carcinoma de células não pequenas. Fator de crescimento insulinóide I também tem papel em carcinoma de células pequenas.

Embora a maior parte desses tumores produzam peptídeos e expresse receptor de peptídeo, há considerável heterogeneidade com respeito a receptor específico expresso. Por esta razão, antagonistas de receptor peptídico específico não parece ser tão efetivo quanto antagonistas de amplo espectro em inibir crescimento de células neoplásicas pulmonar. Um desses antagonistas de amplo espectro, derivada da substância P, está em estudo fase I no Reino Unido(3). Estudos recentes nos EUA mostraram que esta substância causa uma sinalização discordante, que simula apoptose além de inibir crescimento de célula tumoral. Outros agentes com esse efeito, incluindo dímero antagonista de bradicinina, estão em fase de desenvolvimento pré-clínico.

A via intracelular pelo qual os peptídeos exercem seus efeitos proliferativos e apoptóticos, está sendo elucidada.

Muitas drogas anti-inflamatórias não esteróides exercem seus efeitos por inibir as enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase envolvidos no metabolismo do ácido aracdônico. Essas drogas tem sido mostrado ser potencialmente útil na prevenção de canceres de colon e mama, e de inibir o crescimento de células do câncer pulmonar in vitro, e em modelos de ratos atímicos. Sulfonato de sulindac, um metabólito da sulfeto de sulindac, induz apoptose em câncer de mama, pulmão, e colon. Esse componente está em fase I de estudo em pacientes com carcinoma de células não pequenas, para determinar se induzirá regressão tumoral e/ou regressão de lesão pré- maligna, e identificar a dose ideal (4, 5).

Inibidores de invasão e metástases

Câncer pulmonar tem a tendência para invasão precoce e metástases. A matriz de metaloproteinases (MMP) são enzimas usadas por células tumorais para invadir e destruir a membrana basal das células normais. Matriz de metaloproteinases também podem promover metástases através de outros mecanismos. Células do câncer pulmonar pode tanto produzir MMPs e induzir células normais vizinhas a secretar MMP. Alguns inibidores de matriz de metaloproteinases que bloqueiam crescimento de tumores de células pequenas como não pequenas em modelos animais tem sido desenvolvidos. Três de tais inibidores de matriz de metaloproteinases, em mode-

los pré-clínicos tem demonstrado limitar o crescimento, disseminação, e a neovascularização do tumor. Marimastat (MAR), Ag33340, e Bay 12-9566, estão sendo submetidos a teste clínico fase III em carcinoma de células pequenas e/ou não pequenas. Um estudo piloto tem demonstrado que MAR pode ser seguramente combinado com quimioterapia em pacientes com carcinoma de células não pequenas, e em 50% dos quais alcançam uma resposta parcial. BAY 12-95566, uma outra droga mostrando uma atividade similar, está também sob avaliação em combinação com quimioterapia. Há aumento de evidência que inibidores de matriz de metaloproteinases também podem inibir angiogênese como parte de seu efeito antitumor (2,3,5,8).

Tumores primários e suas metástases requerem novas formações vasculares (angiogênese) para crescimento e sobrevida. Tumores com alta densidade de microvasos tem prognóstico pior em carcinoma de células não pequenas no estágio I e uma maior incidência de doença metastática ( ). Há numerosos promotores naturais e inibidores de angiogênese, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que estimula crescimento de células endoteliais. Inibidores de VEGF, tais como anticorpo anti-VEGF, inibe crescimento de vasos sanguíneos, angiogênese, e crescimento tumoral.

Pelo fato de que canceres pulmonares poderem estar associados com expressão aumentada de VEGF, anticorpo anti VEGF estão entrando em estudos clínicos designados para avaliar seu papel no tratamento desta doença. Endostatina e angiostatina são inibidores naturais de angiogênese que tem mostrado inibir crescimento de inúmeras neoplasias malignas humanas, mas não tem sido avaliados em câncer pulmonar. Talidomida é um inibidor de angiogênese, e está sendo examinada em estudos clínicos para seu efeito contra câncer pulmonar, tumores cerebrais e outras neoplasias (3).

Inibidores de angiogênese causam diminuição dramática de metástases e crescimento tumoral em modelos animais.

Algumas substâncias tem sido avaliadas, mostrando atividade inibitória contra proliferação vascular em fase I - TNP 470, SU 5416, MSI 1256F (squalamina lactato) etc, e provavelmente entrará logo em prática clínica padrão (3,5).

Inibidores da proteína C quinase

Ativação de proteína C quinase é um passo comum na via de trasdução de sinal intracelular de muitos dos fatores de crescimento. Estudos recentes sugerem que ativação de proteína C quinase pode também inibir apoptose. Numerosos inibidores de proteína C quinase, tais como briostatina e dolostatina, tem sido desenvolvidos. Em estudos pré-clínicos, esses componentes inibem o crescimento de canceres humanos in vitro e in vivo. Fase I e II de estudos clínicos estão sendo conduzidos com vários inibidores de proteína C quinase (8).

Genes supressores de tumores

Se os genes supressores de tumor forem inativados por lesões genéticas, as células ficam livres da restrição ao crescimento normalmente imposta pelos produtos desses genes, levando ao crescimento desordenado de células tumorais.

Interação com a matriz extracelular e com as células vizinhas, esses genes desempenham importante papel na diferenciação celular, no controle da divisão e da apoptose, ou morte celular programada. Receptores celulares para elementos da matriz, como algumas integrinas, receptores de membrana envolvidos na adesão célula-célula, como as cadeínas e outras moléculas de adesão celular (CAMs) além de elementos do citoesqueleto celular envolvidos na transdução dos sinais decorrentes do atracamento das células às vizinhas ou à matriz, também são considerados genes supressores, além dos fatores de transcrição clássicos como p53, p16 e Rb. Mutações que apenas alteram o sentido de um aminoácido são eficazes para inativar p53 (6).

O protótipo do gene supressor de tumor é o gene do retinoblastoma (Rb), uma fosfoproteína nuclear envolvida na regulação do ciclo celular localizada no cromossomo 13q. A proteína do gene do retinoblastoma é ativado quando fosforilado. A proteína ativada inibe a progressão da fase G0/G1 para a fase S do ciclo celular. Estudos proteícos mostraram que a proteína Rb1 está alterada em 80% dos tumores e linhagens de células dos pacientes com carcinoma de células pequenas. Nos tumores de células não pequenas esta alteração encontra-se em apenas 20%

dos casos estudados. A transfecção de um gene Rb1 normal para linhagem de células tumorais, com genes do retinoblastoma defeituosos, restaura a produção de proteína Rb1 normal pela célula tumoral e reverte o fenótipo de malignidade. Células do carcinoma de células não pequenas tem expressão normal da proteína do Rb, contudo, sua regulação do ciclo celular do G0/G1 para a fase S é alterada por outros mecanismos impedindo fosforilação do Rb. Assim Rb é incapaz de inibir progressão para a fase S. O gene supressor de tumor, p16, normalmente inibe ativação de CDC (complexos quinase dependente de ciclina) 4 e 6, que subsequentemente previne fosforilação de Rb e perda de controle do G0/G1 para S. Quando a função do p16 está ausente através da perda do gene, mutação do gene, ou silenciamento do gene por metilação, CDC 4 e 6 falham em fosforilar Rb, que leva a Rb inativo e subsequente progressão do ciclo celular para a fase S (3).

Há freqüente perda de genes supressores de tumores durante a patogênese e progressão de câncer pulmonar, como em muitos outros carcinomas epiteliais. O p53 é talvez o gene supressor de tumor mais freqüentemente perdido em todos canceres epiteliais e pulmonares. Mutações de p53 estão presentes em cerca de 80% dos carcinomas pulmonares, e pode estar relacionado com fumo do cigarro, que causa mutações específicas em p53 e resulta em produtos de gene inativos. Ambas as cópias dos genes supressores de tumores estão usualmente mutados ou perdidos no fenótipo do câncer. Essas mutações também são observados em 50-80% das displasias graves e lesões de carcinoma in situ. Vários investigadores tem mostrado que terapia de reposição com p53 tipo selvagem inibe crescimento de câncer pulmonar in vitro, e que terapia com gene p53 feitas com vetores adenoviral ou retroviral inibem o crescimento de tumores pulmonares humanos com p53 mutado em animais experimentais (6). A inibição de crescimento foi muito mais evidente quando o animal foi tratado também com cisplatina, sugerindo que p53 aumenta o efeito apoptótico induzido pela cisplatina. Esses estudos conduziram ao estudo fase I em humanos em que o gene sector p53 foi injetado localmente nas lesões metastáticas de subcutâneo por injeção por agulha, ou dentro das lesões obstrutivas intrabrônquicas, via um broncoscópio. Apesar de alguns tumores regredirem, liberação sistêmica de terapia gênica permanece um obstáculo para uso amplo desta abordagem (8).

Oncogenes dominantes

Superexpressão de oncogenes dominantes tem papel na progressão de carcinoma pulmonar, e parecem ser um evento tardio na patogênese do câncer pulmonar.

O oncogene mais comumente superexpressa são os genes da família myc em carcinoma de células pequenas e os oncogenes ras, HER-1, e HER-2/neu em carcinoma de células não pequenas.

Oncogenes da familia myc produzem proteína que quando expresso no núcleo, conduz a proliferação celular. Superexpressão de myc ocorre na maioria dos carcinoma de células pequenas, mas é rara no carcinoma de células não pequenas. Em modelos pré-clínicos, myc pode ser inibida por oligonucleotídeos de sentido oposto e pela transfecção de genes myc mutados. Não há estudos clínicos para esta abordagem, pela dificuldade de liberação sistêmica do gene (6).

O oncogene ras é mutado em 20-40% dos adenocarcinoma de pulmão mas raramente em outros tipos celulares. Mutações do gene ras estão associados com mau prognóstico. Expressão de ras mutada pode ser inibida por oligonucleotídeos de sentido oposto construídos e por drogas que inibem ativação de ras. Farnesilação é requerida para o ras translocar de seu estado inativo no citoplasma para seu estado de membrana ativa; e portanto, vários inibidores de farnesilação tem sido submetidos à avaliação pré-clínica e estão entrando em estudos clínicos (6,7,9). O receptor HER2 é o receptor transmembrana codificado pelo proto-oncogene c-erb B2. O proto-oncogene c-erb B2 codifica um receptor de glicoproteína transmembrana que tem homologia para fator de crescimento epidérmico e compartilha atividade tirosina quinase com aquele receptor. A superexpressão ou mutação de HER2 foi achado em vários tumores humanos, e está mais freqüentemente expressa no carcinoma de mama, e quando presente com linfonodo axilar positivo conferiu um pior prognóstico, além de baixa taxa de resposta a quimioterapia. Está presente em cerca de 20-25% de carcinoma pulmonar, e está sen-

do relacionado a um prognóstico pior, e resistência a quimioterapia (3,6). Trastuzumab (Herceptin) é um anticorpo monoclonal humanizado e liga a domínio extracelular de receptor HER2, causando a inibição de proliferação de células HER2 superexpresso, e citotoxicidade anticorpo dependente na presença de células mononucleares do sangue periférico. Estudos clínicos conduzidos avaliando a atividade de Herceptin, aumentaram a resposta a quimioterapia padrão em carcinoma de mama. Estudos clínicos são necessários para explorar o efeito deste anticorpo sozinho ou em combinação com quimioterapia contra adenocarcinoma de pulmão em pacientes com superexpressão HER-2/neu (8).

O bcl 2 é um oncogene tumoral que inibe apoptose e pode ser superexpresso por ativação ou amplificação. A superexpressão está associada a um prognóstico pior e resistência a droga, e é um alvo terapêutico lógico (8)

CONCLUSÃO

Avanços no entendimento da biologia molecular e bases da biologia do câncer de pulmão sugere otimismo para o futuro da terapia do câncer de pulmão no novo milênio. Há atualmente agentes quimioterápicos mais efetivos do que existia no passado, e um número de novos agentes baseados na biologia molecular e biologia do câncer de pulmão traz promessa para mais progressos no futuro.

Inibidores de fatores de crescimento

inibidores de EGF imunotoxinas de receptor de EGF	Anticorpos de receptores de EGF e EGF
antagonistas de hormônios peptídicos	derivados da substância P, dimeros, dímeros antagonistas de bradicinina
inibidores de matriz de metaloproteinases	marimastat, batimastat Ag33340 Bay 12-9566
agentes antiangiogenica	endostatina, angiostatina ac anti VEGF, ribozimas ac receptores de VEGF, ribozimas talidomida
inibidores NSAIDs, Cox, Lox	sulindac, sulfona sulindac (FGN-1)
inibidores de proteina c quinase	dolostatin

Referência bibliográfica

1.Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine growth factors and cancer. Nature 1985, 313: 747-751

2.Bunn Jr, PA, Soriano A, Johnson G, Heasley L. New therapeutic strategies for lung cancer. Chest 2000, 117(4suppl 1):163S-168S.

3.Carbonne DP. The biology of lung cancer. Semin Oncol 1997, 24: 388-401.

4.Soriano A, Chan D, Helfrich B. Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDS) inhibit the in vitro and in vivo growth of human lung cancer. Proc Am Assoc Cancer Res 1998, 39: 1336.

5.Dubinett SM, Miller PW, Sharma S, Batra RK. Gene Therapy for lung cancer. Hematology/Oncology Clin of North Am 1998, 12: 569-594.

6.Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. J Thorac Cardiovas Surg 1999, 118: 1136-52.

7.Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio . K-ras oncogene ativation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med 1990, 323: 561-565.

8.Comelle P, SICOG. Tumori 2000, 86(suppl 1-5): 547-550.

9.Comis RL, Finley RS. Future directions in the treatment of non-small cell lung cancer. Semin Oncol 1999, 26(suppl 18): 14-18.