

Genética do câncer de pulmão

Genetics of lung neoplasms

Vera Luiza Capelozzi*

RESUMO: O câncer de pulmão é uma das neoplasias de mais alta mortalidade. Biologicamente é a expressão das alterações genéticas nas células epiteliais das vias aéreas. É necessário estudar a genética e patologia para que possamos chegar a melhores respostas quanto ao tratamento, diagnóstico e evolução da doença.

DESCRITORES: Neoplasias Pulmonares/patologia; Neoplasias Pulmonares/genético; Oncogenes/genética; Mutação; Ciclo Celular.

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista clínico, o câncer de pulmão representa uma das doenças neoplásicas de mais alta morbidade e mortalidade, em parte pelo estadio avançado em que os pacientes se apresentam, por ocasião da sintomatologia. O que fazer para controlar? Detectar precocemente a doença? Conhecer os mecanismos de tumorigênese? Estabelecer medidas terapêuticas contra os mecanismos de tumorigênese?

Do ponto de vista biológico, o câncer de pulmão é a expressão fenotípica do acúmulo de alterações genéticas ao longo das células epiteliais de revestimento das vias aéreas. Estas alterações genéticas resultam em uma proliferação celular incontrolável por interferência no ciclo celular ou inibição da morte celular programada (apoptose). Desta forma, o avanço no conhecimento das causas de proliferação celular poderá trazer importantes implicações no diagnóstico precoce e no estabelecimento de novas estratégias terapêuticas.

O conhecimento dos fatores genéticos e moleculares envolvidos na carcinogênese pulmonar iniciou-se em 1960 com a citogenética. Sofreu grande avanço em 1980 com o conhecimento dos oncogenes envolvidos e atingiu o ápice em 1990 com a identificação dos genes supressivos tumorais (on-

cogenes recessivos ou antioncogenes). Tais fatores genéticos, que interferem com o ciclo celular ou a apoptose, potencialmente influenciados por fatores ambientais, como o fumo e a poluição, tem permitido uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares no desenvolvimento do câncer de pulmão. Portanto, a análise de tais fatores permitirá compreender os efeitos resultantes no tratamento com novos agentes, tipos histológicos, diagnóstico, riscos de recidiva e sobrevida.

SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER DE PULMÃO

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que algumas formas de câncer são comuns em famílias, sugerindo que a susceptibilidade ao câncer pode ser herdada. Já o câncer de pulmão é mais comumente tido como uma forma de câncer determinada apenas pelo ambiente (fumo, mineradores de urânio). Contudo, com base em evidências clínicas, diferentes graus de susceptibilidade para a formação de tumores devido a agentes ambientais tem sido postulados.

Evidências epidemiológicas para um aumento do risco familiar de câncer do pul-

* Professora Associada do Departamento de Patologia da FMUSP.
Endereço para correspondência: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br

mão foi notada em 1960. No maior estudo até o momento, um risco de 2,4 para câncer de pulmão foi identificado em parentes de pacientes com câncer de pulmão¹. Este risco familiar é suportado por recentes dados colhidos na população de Utah². Identificou-se uma tendência familiar ao câncer de pulmão, sendo que as mulheres jovens não fumantes apresentam um risco maior do que os homens.

Estudos genealógicos destas famílias sugerem um caráter codominante de herança Mendeliana transmitida através de um gene autossômico raro. Este modelo sugere que portadores deste gene desenvolvem câncer de pulmão precocemente, com um risco de 2245 maior em indivíduos homozigotos não fumantes.

ALTERAÇÕES GENÉTICAS ADQUIRIDAS: ONCOGENES

Nem todo câncer de pulmão tem a herança familiar de base. Desta forma, tumores esporádicos ou de causa não familiar não são devidos a mutações nas linhagens germinativas ou a um gene de susceptibilidade ao câncer, resultantes de transmissão por herança, mas sim devidos a alterações genéticas somáticas adquiridas. A primeira evidência convincente que o câncer poderia ser decorrente de elementos genéticos não herdados foi a observação por Rous em 1911 que filtrados celulares de um sarcoma de galinha poderiam induzir sarcomas em outras galinhas. Demonstrou-se que o potencial oncogênico de um vírus, o vírus do Sarcoma Rous, eram resultantes de um gene celular mutante específico chamado *v-src*. Assim, a partir da identificação deste oncogene, mais de 50 diferentes oncogenes tem sido implicados no desenvolvimento do câncer humano.

Oncogenes são derivados de genes celulares normais chamados proto-oncogenes. A proteína codificada resultante de um proto-oncogene tem um papel importante na regulação do crescimento celular. A ativação dos oncogenes pode resultar de mutação, translocação cromossômica, amplificação e desregulação na transcrição, resultando na produção de uma proteína anormal ou na hiperprodução de proteínas normais. Agora estes proto-oncogenes ativados são chamados de oncogenes e suas proteínas codificadas de oncoproteínas.

Nomenclatura: Proto-oncogenes e oncogenes são denominados por tres letras em itálico (p.e., *myc*). As mesmas tres letras não itálicas e começando com maiúscula designam as as proteínas codificadas (p.e., *Myc*). O prefixo *v*, como em *v-src*, refere-se a um oncogene de origem viral. Ao proto-oncogene correspondente é dado o prefixo *c* (*c-src*).

Em sua forma ativada, os oncogenes propiciam um crescimento exacerbado para a célula que os expressam. Observações laboratoriais, clínicas e epidemiológicas sugerem que há necessidade de vários eventos genéticos ou bioquímicos para transformar as células normais em células neoplásicas. Portanto, acúmulos sucessivos de eventos críticos em uma população celular com crescimento exacerbado resultam em carcinogênese. Uma vez que a célula normal tenha se transformado em célula neoplásica (i.e., crescimento incontido), outros eventos são requeridos para que as células malignas proliferem com sucesso, principalmente a provisão de novos vasos nutrientes (angiogênese) para então criar um microambiente favorável ao crescimento. A interação entre as alterações genéticas nos núcleos celulares e as alterações necessárias para o microambiente celular, tais como suprimento vascular, nutrição e matrix extracelular, estão começando a ser estudadas. A inter-relação entre estes fatores podem exercer papel crítico nos vários graus de malignidade de um câncer.

Cinco categorias de proto-oncogenes são descritas:

- ⇒ fatores de crescimento,
- ⇒ receptores para fatores de crescimento ou hormônios,
- ⇒ tradutores de sinais intracelulares,
- ⇒ fatores de transcrição nuclear
- ⇒ proteínas controladoras do ciclo celular

Há duas classes de oncogenes: *oncogenes dominantes* e os *oncogenes recessivos* (ou *genes tumorais supressores*).

Oncogenes dominantes são facilmente identificados uma vez que eles tem um efeito genético dominante em converter uma célula não-transformada em uma célula transformada (maligna). Nestas circunstâncias, somente um de seus dois alelos portador de um gene específico necessita ser afetado.

O conceito de oncogenes dominantes e suas resultantes oncoproteínas está ilus-

trado na **FIGURA 1A**. Nesta figura também podem ser apreciados oncogenes envolvidos no câncer de pulmão.

Evidências de uma segunda classe de genes ativos na carcinogênese - *oncogenes recessivos ou genes supressores tumorais* - tem sido mais difícil de estabelecer. A evidência mais antiga da existência de genes tumorais supressores na carcinogênese advém de estudos genéticos em células somáticas através da fusão de células normais e neoplásicas. Surpreendentemente, as células híbridas resultantes não foram neoplásicas, um achado não esperado caso um oncogene dominante estivesse envolvido. Se a transformação fosse devida a um oncogene suprido por um dos membros do híbrido, a presença de informação genética normal suprida pelo outro membro deveria não ter efeito na transformação. Esta observação conduziu à noção que a célula neoplásica havia perdido a informação genética de ambos alelos paterno e materno de locus genético crítico, que por sua vez foi substituído pela célula normal no híbrido.

Retinoblastoma – Outra evidência para a existência de genes supressores tumorais foi fornecida por estudos de genética e história natural em tumores pediátricos, particularmente, no retinoblastoma. Foi proposto que o desenvolvimento do retinoblastoma poderia ser explicado pela aquisição de duas mutações (i.e., uma mutação em ambos alelos do mesmo locus genético). Para cada gene do locus, o genoma humano tem duas cópias gênicas, uma materna e outra paterna. Uma mutação foi proposta estar presente em uma linha germinativa de um dos pais e portanto anor-

mal em todas células somáticas do filho afetado ao nascimento. Com a aquisição de uma segunda mutação no alelo normal remanescente, a proteína codificada pelo gene afetado tornou-se funcionalmente inativa, e a célula retinoblástica sofreu transformação maligna. Após elegante análises citogenéticas e moleculares, foi determinado que um alelo do gene do retinoblastoma (*Rb*) foi inativado na forma herdada do retinoblastoma de acordo com a hipótese prévia. Com a inativação do outro alelo do retinoblastoma, um retinoblastoma desenvolveu-se.

O conceito de oncogenes supressores é mostrado na figura 1B, que também delinea os oncogenes recessivos encontrados no câncer de pulmão.

ONCOGENES RECESSIVOS

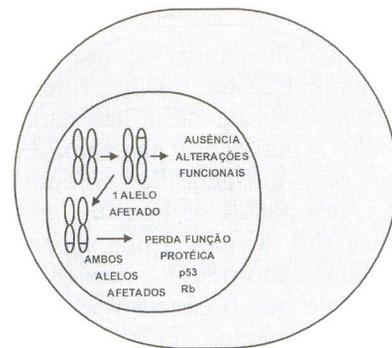


Figura 1B

ALTERAÇÕES MOLECULARES

Alterações Citogenéticas

Alterações cromossômicas são informativas em tumores à medida que elas apontam para uma área específica a ser examinada no genoma à procura de mutações ou perda da informação genética para o controle regulatório do crescimento. Inicialmente, alterações cromossômicas foram identificadas ao exame dos cromossomos em uma célula em divisão ao microscópio de luz. Esta tarefa, conhecida como citogenética, foi o início da compreensão genética de muitas alterações malignas, e teve início com a identificação do cromossoma Philadelphia em 1960. No

ONCOGENES DOMINANTES

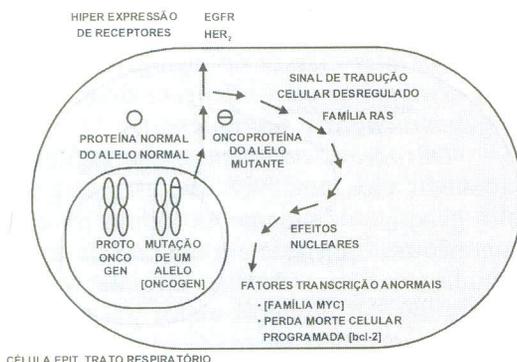


Figura 1A

câncer de pulmão, alterações citogenéticas ou do cariótipo em carcinomas de pequenas células (CPC) tem sido repetidamente demonstradas, com deleções no braço curto (p) do cromossomo 3 (3p), especificamente 3p21-25, sugerindo um gene supressor tumoral neste sítio. Também tem sido identificadas perdas citogenéticas do braço longo (q) do cromossomo 5, (5q21), 13 (13q14), e 17 (17q13), estes dois últimos sítios contendo o locus supressor para os genes *Rb* e *p53*. Adicionalmente, nos carcinomas de células não pequenas (CCNP) numerosas anormalidades genéticas tem sido vistas através de estudos citogenéticos, mais frequentemente em 3p14, 3q21, 19q13, 11p15, 1q11, 7q11, 1q21, 3p23 e 3p21, sendo que até o momento não foram ainda identificados os genes envolvidos em tais áreas.

Oncogenes Dominantes

Família Myc - a família *myc* de proto-oncogenes inclui proteínas nucleares que tem propriedades de ligar DNA e com função ativa na regulação da transcrição. Há três membros desta família, *c-myc* (cromossomo 8q24), *N-myc* (cromossomo 2p23-24) e *L-myc* (cromossomo 1p23). Ativação desta família de proto-oncogenes no câncer de pulmão ocorre por amplificação e superprodução de produtos proteicos normais. Amplificação de todos os membros desta família tem sido encontrada no CPC. Os genes *myc* codificam três fosfoproteínas nucleares relacionadas especificamente ao ciclo celular. Clinicamente, a amplificação do gene *c-myc* tem sido associada a curso mais maligno nos CPC. A hiperexpressão dos genes *N-myc* nos CPC tem sido correlacionada a pouca resposta à quimioterapia. A compreensão destas anormalidades tem levantado a possibilidade de terapêuticas dirigidas contra o gene *c-myc*. A exposição de uma linhagem de células de CPC expressoras do gene *L-myc* a um DNA anti *L-myc* inibe o crescimento celular de forma dose dependente, sugerindo talvez uma oportunidade terapêutica. Amplificação dos genes *myc* também ocorre em CCNP, principalmente *c-myc*, porém desprovida de significado clínico.

Ras - há três proto-oncogenes *ras*: *H-ras*, *K-ras* e *N-ras*. Estes genes codificam proteínas ligadoras do grupo guanossina trifosfato (GTP), conhecidas como p21ras, que são funcionalmente relacionadas e tem se-

melhanças estruturais com as proteínas G. Esta proteína slocalizam-se do lado interno da membrana celular e participam do sinal de transdução. Pontos de mutações específicas *K-ras* são relativamente comuns em CCNP, especificamente nos adenocarcinomas. Estas mutações resultam em uma única modificação no aminoácido da proteína, levando a uma marcada redução na atividade da GTPase intrínseca, permanecendo a proteína em um estado ativo de ligação com a GTP, que impedindo a sua liberação. Uma vez adquirida, estas mutações parecem ser estáveis, permanecendo tanto no tumor primário quanto nas metastases, como acontece com a maioria das mutações genéticas. Mutações dos genes *H-ras* e *N-ras* são raras em cancer de pulmão humano. Como cresce a sensibilidade dos ensaios, a incidência de mutação *K-ras* continua a aumentar, ocorrendo em mais de 56% dos casos de câncer de pulmão.

Mutações do gene *K-ras* tem sido detectada em biópsias brônquicas de indivíduos fumantes sem evidências de câncer de pulmão³, podendo ainda ser encontradas em esfregaços de escarro anos antes do diagnóstico clínico de câncer de pulmão⁴, levantando a possibilidade de seu uso como marcador de pré-malignidade. Adicionalmente, exame da distribuição das mutações *K-ras* em tumores já estabelecidos sugerem que estas alterações ocorrem precocemente no desenvolvimento da neoplasia⁵

O carcinógeno determinante das mutações *K-ras* é desconhecido, mas tem sido intimamente associadas com a exposição ao fumo⁶. Não está estabelecido se este é um fator causal ou meramente uma associação. Clinicamente, a presença de mutação *K-ras* em um adenocarcinoma é um potente indicador de pouca sobrevida⁷. A presença desta discreta alteração molecular tem conduzido ao desenvolvimento de novos protocolos de tratamento. Crescimento tumoral em linhagens celulares expressando mutações *K-ras* é marcadamente diminuído por um anti RNA *K-ras* construído através da introdução de um vetor retroviral⁸. Desta forma, uma melhor compreensão desta alteração molecular no câncer de pulmão tem conduzido ao reconhecimento de um importante fator prognóstico negativo, um possível marcador de pre-malignidade e uma nova estratégia terapêutica.

Proteína Ras - o produto proteico do gene *ras* (p21ras) tem sido também demonstrado como um importante fator prognóstica definição de sobrevida em CCNP⁹ Pacientes cujos tumores tem altos níveis de expressão de p21ras tem sobrevida inferior em relação àqueles cujos tumores são p21ras negativos. De grande interesse é a observação recente que inibidores da atividade p21ras podem trazer uma estratégia viável no tratamento por interferir com a modificação lipídica da molécula. Com o uso de inibidores da farnesiltransferase (FTI276) o crescimento de um câncer de pulmão humano com mutação K-ras foi inibido em animal de maneira dose dependente¹⁰.

Genes Tumorais Supressores

Gene Retinoblastoma - o gene retinoblastoma, localizado no 13q, foi o primeiro gene supressor tumoral identificado, traduzindo sua importância na gênese do retinoblastoma hereditário. Ele codifica uma fosfoproteína nuclear 105,000-Da (pRB) que é uma reguladora da divisão celular. O estado de fosforilação da pRB é a chave para a progressão celular através do ciclo celular. pRB é subfosforilada em G1, é pesadamente fosforilada na fase G1 tardia antes da fase S, mas reverte a um estado subfosforilado antes da fase G0. pRB em seu estado subfosforilado liga-se à família E2F de fatores de transcrição, não permitindo a transcrição E2F-induzida de genes, importante para a progressão no ciclo celular. Isto resulta em um bloqueio de entrada na fase S, causando em última análise parada na divisão celular. pRB isolada de tumores é frequentemente mutada, resultando em uma proteína funcionalmente inativa incapaz de ligar E2F ou ser regulada por fosforilação, desta forma tornando desregulada a proliferação celular.

Defeitos no gene *Rb* ou na proteína pRB são quase universais em CPC mas são encontrados apenas em 30% dos CCNP. Não tem sido encontrada relação com a sobrevida. A importância central do pRB na regulação do crescimento tem sido mostrada por reconstituição do gene *RB* em linhagens CPC. Isto suprime seu crescimento, sem necessitar de correção de outras anormalidades genéticas. Este achado aponta para outra estratégia de tratamento.

Gene p53 - inicialmente, p53 foi tido como um oncogene dominante, pelo fato de que a proteína p53 foi detectada em altos níveis em neoplasias malignas. Todavia, agora é corrente que o tipo selvagem p53 é um regulador do crescimento celular, e mutações no gene p53 podem não produzir proteína p53 como produzi-la disfuncionalmente. A proteína mutante tem uma vida média muito mais longa do que o tipo selvagem, resultando em altos níveis vistos nas células transformadas. O gene p53 está localizado no cromossomo p17. Anormalidades no gene p53 são comuns em câncer de pulmão, usualmente como ponto de mutação. A proteína codificadora (p53) é provavelmente um fator de transcrição nuclear, e é um fator de supressão tumoral por mecanismos ainda não bem elucidados. p53 regula o crescimento celular na interface G1-S do ciclo celular, e tem um papel importante na indução da apoptose, ou da morte celular programada, em células com DNA lesado. Mutações em gene p53 parecem estar associadas com exposição a substâncias ambientais tais como o fumo do cigarro¹¹. Anormalidades na expressão do gene p53 não parece estar associada com prognóstico em tumores pulmonares mistos¹², mas confere um prognóstico pior em pacientes com adenocarcinomas estadio I¹³. Tem sido demonstrado em modelos animais que o gene p53 tipo selvagem pode ser transduzido em esferóides tumorais de câncer de pulmão com um vetor retroviral. Se as células tumorais forem homozigotas para um mutante p53, não haverá significativa inibição do crescimento após transdução e expressão do p53 tipo-selvagem, com a apoptose induzida no esferóide celular. Isto levanta a possibilidade de uma nova estratégia terapêutica em cancer de pulmão com mutação no gene p53.

Outros Proto-Oncogenes e Oncoproteínas

Outros oncogenes no câncer de pulmão parecem exercer seus efeitos através da hiperprodução de proteínas codificadoras normais, sem necessariamente haver genes mutantes ou produção de proteínas anormais. A hiperprodução sugere um defeito regulatório na transcrição do gene ou na amplificação gênica. Os genes e produtos proteicos que comumente atuam desta maneira são c-erbB-1 e c-erbB-2, ambos quinases tirosinas receptores.

c-erbB-1 - este proto-oncogene ligado a membrana codifica um receptor de crescimento quinase tirosina 170,000-Da que é o receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR). O proto-oncogene, através de seu produto proteico, funciona no pulmão normal para estimular a proliferação celular epitelial e para promover a maturação das vias aéreas durante o desenvolvimento embrionário. Hiperexpressão do proto-oncogene tem sido encontrada em CCNP, especialmente o carcinoma de células escamosas, em 65 a 90% dos casos reportados. O uso da hiperexpressão do gene *c-erbB1* como marcador de prognóstico clínico é controverso, com alguns estudos mostrando associação com pobre sobrevida e outros não.

c-erbB-2 - este proto-oncogene pertence à família *c-erbB-1* de receptores ligados à membrana quinase tirosina, portanto está relacionado estruturalmente ao *c-erbB-1*. A proteína codificadora, chamada p185c-*erbB-2* ou HER2, também é expressa nas células epiteliais das vias aéreas do pulmão normal e tem um papel no crescimento e diferenciação do epitélio pulmonar normal. HER2 é coproduzida com EGFR em muitos adenocarcinomas de pulmão.

A PROGRESSÃO DO EPITÉLIO DAS VIAS AÉREAS NORMAIS PARA EPITÉLIO MALIGNO

Como anteriormente descrito, muitas anormalidades genéticas podem ser encontradas em câncer de pulmão. Evidências correntes sugerem que muitos eventos, ambos genéticos e epigenéticos, são necessários para a transformação das células normais em células neoplásicas. É lógico portanto postular que com o acúmulo destes eventos, a(s) célula(s) envolvidas poderão ter características alterações genéticas, bioquímicas, e morfológicas. Quantos eventos são necessários para a transformação maligna de uma célula epitelial pulmonar e em que ordem elas ocorrem no câncer de pulmão constitui uma área de intensas pesquisas. A carcinogênese coloretal fornece um útil paradigma para compreensão deste processo. E mais, pode ser diretamente relevante ao câncer de pulmão, desde que embriologicamente o pulmão se desenvolve a partir dos intestinos, e ambos

órgão são constantemente expostos a carcinógenos externos. Em adição, a emergente associação de câncer de pulmão com conhecidos genes do câncer coloretal é de grande interesse.

Carcinogênese Coloretal

Morfológicamente, carcinomas coloretais aparecem de adenomas pré-existentes, que por sua vez aparecem em áreas de mucosa hiperproliferativa ou de mucosa com histarquitectura anormal. Portanto, mucosa normal sofre alterações que resultam em alterações proliferativas ou estruturais e formam microadenomas. Com a progressão, o microadenoma torna-se um adenoma precoce, um adenoma intermediário, um adenoma tardio, e finalmente um carcinoma. Através de análises genéticas moleculares do tecido coloretal nestes estádios definidos de morfologia, certas alterações genéticas tem sido encontradas em alta frequência. Estes estudos tem se tornado a base para assegurar uma via multifatorial de alterações genéticas que correspondem às alterações fenotípicas encontradas na mucosa, sumarizadas na **FIGURA 2**.

Muitos estudos tem sido realizados em pacientes com polipose adenomatosa familiar. Estes pacientes sofrem de uma lateração autossômica dominante que resulta em formação difusa de polipos colônicos, e que condiciona alto risco para desenvolvimento do cancer coloretal. Nesta síndrome, mutações na linha germinativa (e portanto herdada) no gene *APC* são tidas como responsáveis pela hiperproliferação epitelial encontradas no estádio inicial. Em pacientes que não tem este defeito herdado, LOH no cromossomo 5q e/ou mutações somáticas do gene *APC* podem ter um papel nos estádios precoces. LOH envolvendo cromossomos 18q e 17p e mutações no *DCC* (deleção no carcinoma coloretal) e genes *p53* ocorrem mais tardiamente na tumorigênese e são infrequentes nos estádios precoces. Mutações no gene *K-ras* ocorrem durante a transição de adenoma precoce para adenoma intermediário. Embora este modelo seja lógico e suportado pelas alterações histológicas e estudos genéticos, provavelmente é incompleto e simplista.

O modelo anterior pode ser aplicado para compreensão do desenvolvimento do câncer de pulmão, com semelhanças e importantes diferenças. O câncer de pulmão

PROGRESSÃO DO EPITÉLIO NORMAL PARA NEOPLÁSICO

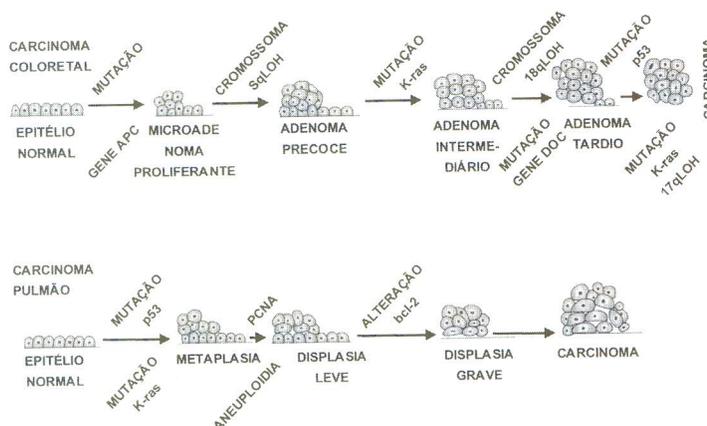


Figura 2

desenvolve-se através de muitos estadios de bem definidas alterações epiteliais histológicas. As alterações mais precoces incluem metaplasia escamosa, seguida por displasia, carcinoma in situ, carcinoma microinvasivo e carcinoma invasivo¹⁴⁻¹⁵ Enquanto nenhum estudo longitudinal tenha definitivamente implicado lesões metaplásicas e displásicas como pré-malignas, há fortes evidências circunstanciais que suportam a noção de que displasia epitelial representa um estadio precoce no desenvolvimento do carcinoma broncogênico.

Em um estudo de 14.414 homens fumantes, a presença de metaplasia escamosa atípica ao exame citológico do escarro foi considerada um indicador de uma modesta elevação no risco de carcinoma broncogênico¹⁶ Talvez o fator mais forte que faz esta ligação é a relação dose-resposta entre o número de cigarros fumados por dia e a frequência de lesões displásicas no epitélio bronquico. Estas alterações são mais evidentes nos carcinomas de células escamosas do pulmão, conforme tem sido evidenciado através de cortes seriados ao redor de carcinomas de células escamosas microscópicos¹⁷, não sendo porém elas tão evidentes nos adenocarcinomas, devido à inabilidade em estudar tumores pulmonares periféricos, local onde estes tumores aparecem. Há consideráveis evidências, porém, que uma sequência de alterações morfológicas ocorrem na mucosa brônquica, consistentes com o modelo de múltiplos estadios de carcinogênese para que o câncer de pulmão desenvolva-se.

É de grande interesse, todavia, examinar se as alterações genéticas ocorrem em um caráter de seleção no epitélio brônquico para poder correlacionar com as alterações morfológicas. Informações limitadas avaliáveis levam à conclusão que acúmulo selecionado de alterações genéticas também ocorram no câncer de pulmão. Não é surpresa, que os eventos e seu tempo diferem do carcinoma colorectal, indubitavelmente refletindo diferenças no epitélio, no microambiente e na exposição ao carcinógeno. A alteração molecular mais estudada tem sido a expressão do gene *p53*. Em várias análises de lesões pulmonares pré-neoplásicas e neoplasias pulmonares, alterações nos níveis definidos imunohistoquimicamente de expressão do *p53* (que implica em mutação do *p53*) ocorrem precocemente, com anormalidades *p53* encontradas em lesões metaplásicas e leve ou moderadas lesões displásicas (10 a 30% dos casos). A frequência de alterações *p53* saltam para mais de 60% em displasia severa e pode ser tão alta quanto 80% nos carcinomas. Alterações moleculares posteriores tem sido o LOH do 3p e o LOH do 9p, descritas no estadio de displasia severa. Hiperproliferação é evidente durante a displasia precoce, quando o antígeno de proliferação nuclear (PCNA), um marcador de proliferação celular, é encontrado em até 33% dos espécimens, em contrapartida com os 25% nos espécimens de epitélio normal. Isto aumenta para 40% nos casos de displasia severa e para mais de 85% no estadio de carcinoma in situ. Este estudo sugere que hiperproliferação é rapidamente seguida por DNA aneuploidia e então *p53* imunoreatividade. Instabilidade genética é evidente precoce-

mente a história natural do carcinoma broncogênico, com DNA aneuploide encontrado em 8% dos espécimens com displasia leve, 33% com displasia severa e 100% com carcinoma in situ. Mutações *K-ras* não tem sido estudadas tão completamente como o p53, mas elas tem se mostrado precocemente no curso da tumorigênese pulmonar, principalmente nos adenocarcinomas.

As informações necessárias para construir um paradigma tão completo na tumorigênese pulmonar quanto na carcinogênese coloretal não tem sido disponível, embora esteja sendo derivada. A **FIGURA 2** ilustra as informações vigentes para sua compreensão.

IMPACTO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES GENÉTICAS SOBRE O CICLO CELULAR

Nas linhas precedentes foram identificados numerosas alterações genéticas que tem sido encontradas em câncer de pulmão que permitem a proposição de um paradigma em múltiplos estádios para o desenvolvimento do câncer de pulmão. Ainda não está claro, todavia, se estes eventos molecular-genéticos são causa ou simplesmente estão associados com o câncer de pulmão. Seriam estes eventos diretamente responsáveis pela gênese do câncer de pulmão? A resposta para esta questão é desconhecida, mas há evidências que sugerem que alguns destes eventos podem ter um papel direto na tumorigênese pulmonar. A nível mais simples, transformação maligna representa tanto a perda do controle de crescimento ou a perda da morte celular programada (apoptose). Assim, se alterações genéticas que ocorrem no câncer de pulmão afetam o controle do crescimento ou a apoptose, um papel causativo pode ser implicado.

Recentemente, muito se tem aprendido a respeito dos eventos que regulam o crescimento celular. Todos oncogenes e alterações genéticas descritas anteriormente tem impacto na regulação do crescimento celular. Dentro deste contexto, muitas das alterações genéticas já discutidas afetam o ciclo celular. EGFR e HER2 são receptores ligados à membrana que podem iniciar a sinalização e transmitir o sinal de crescimento; p21

é também ativo na sinalização intracelular relacionada à proliferação celular. Myc é fator de transcrição nuclear que pode controlar os genes reguladores do crescimento celular. Os genes tumorais supressores fornecem o melhor exemplo do efeito de alterações genéticas no ciclo celular.

O ciclo celular é dividido em fases distintas - a fase G1 (prepara a síntese de DNA), fase S (síntese do DNA), fase G2 (pós-síntese), e a fase M (mitose). Em vários pontos do ciclo celular, há pontos críticos nos quais as células tem habilidade em determinar se estão prontas a progredir para a próxima fase do ciclo. Estes pontos críticos estão sob influência positiva ou negativa de reguladores. Se a função de um regulador negativo é perdida, ou se um regulador positivo é hiper-expresso, a célula pode progredir à próxima fase do ciclo em um tempo inapropriado. O ponto crítico mais importante é a transição G1-S. Neste ponto, a célula deve determinar a integridade de seu DNA antes da replicação, e portanto não replicar e introduzir qualquer defeito no DNA no código genético. Se a regulação deste ponto crítico é perdida, ou uma mutação inadvertidamente replica em um importante gene regulador do crescimento antes que ele possa ser reparado, resultará crescimento celular incontrolado.

A proteína Rb funciona como uma chave reguladora da passagem de células através da fase G1. A função pRB é regulada pelo seu estado de fosforilação. Durante a fase G1, pRB é primariamente hipofosforilada. Então, a forma supressora da pRB é tida como hipofosforilada. Na fase G1 tardia, pRB sofre sucessivas fosforilações que inativa sua habilidade em suprimir a proliferação celular. A fosforilação da pRB é regulada por um complexo de duas subunidades - a ciclina e a quinase ciclina-dependente (cdk). Especificamente, o complexo ciclina tipo D (D1, D2, D3) com um cdk4 e cdk6 ativado, que faz a mediação da fosforilação da pRB. Os complexos ciclina/cdk por sua vez estão sob controle de uma série de pequenas proteínas inibidoras (p15, p16, p21 e p27). Como é a fosforilação da pRB importante na regulação do ciclo celular? É provável que no estado não-fosforilado, pRB liga e sequestra proteínas específicas necessárias para a progressão no ciclo celular. As proteínas ligadoras incluem membros da família E2F de fatores de transcrição, que são necessários para a

expressão de muitos genes ativos na replicação do DNA (DNA polimerase- α , PCNA). Assim, pRB ligado a E2F previne a transcrição a partir de promotores contendo sítios E2F. Com a fosforilação do pRB, E2F é liberada, ativando a transcrição. E2F DNA sítios de ligação tem sido observadas em vários genes sendo crítica para entrada da célula na fase S. Assim, mutações do pRB que interfiram com E2F ligante, ou afete a fosforilação do pRB por cdk4 ou cdk6, podem resultar em bloqueio de entrada na fase S.

A transição G1-S é também um ponto crítico regulado pelo p53. Estruturalmente, p53 é o mais importante factor de transcrição, sendo por isso importante na reparação do DNA. Em resposta a um dano no DNA, os níveis de p53 aumentam, resultando na indução transcricional de um cdk inibidor do p21. P21 causa um acúmulo de pRB não fosforilado, que por sua vez causa parada na fase G1. A elevação do p53 consequente a um dano no DNA não somente permite parar o crescimento da célula, prevenindo com isso a transmissão de DNA anormal, mas sob condições hipóxicas, a elevação do p53 aciona o mecanismo da apoptose. Em tumores que apresentam mutações do gene *p53*, resultando em uma perda funcional do p53, controle da progressão do ciclo celular ou apoptose pode ser perdido, conduzindo ao crescimento celular progressivo.

Apoptose provavelmente é regulada pelo p53 pelo seguinte mecanismo. Frente a uma inativação do pRB ou expressão ectópica de E2F, entrada na fase S é descontrola-

da. Em tais células, se houver um p53 selvagem de fundo, apoptose tem início. Em um mutante p53 de fundo, apoptose não ocorre, proliferação celular continua, com o resultado final sendo a transformação neoplásica. Assim, p53 regula ambos a progressão no ciclo celular e a apoptose com um papel importante em proteger a célula de DNA lesado duplicado. Estas interações são sumariadas na **FIGURA 3**.

Estes dois genes e os efeitos de suas mutações tem na regulação do crescimento celular ilustra como eventos genéticos podem ter um papel direto na formação de um tumor através do descontrole do crescimento celular. P53 e pRB tem um impacto claro na regulação do ciclo celular; todavia muitos outros eventos genéticos encontrados no câncer de pulmão potencialmente tem um impacto no crescimento celular. P21 tem um papel em sinalizar e em sua forma mutante pode determinar um estímulo para o crescimento descontrolado; a família myc de oncogenes são ativadores de transcrição e em forma mutante determinam transcrição desregulada de genes importantes no ciclo celular.

Estas alterações sugerem alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas formas de tratamento no câncer de pulmão. Muitos destes alvos terapêuticos já tem sido sujeitos de experimentos in vivo e in vitro para avaliar os efeitos do crescimento e diferenciação tumoral. Estes experimentos tem sido descritos em associação com alguns oncogenes ou oncoproteínas e são sumari-

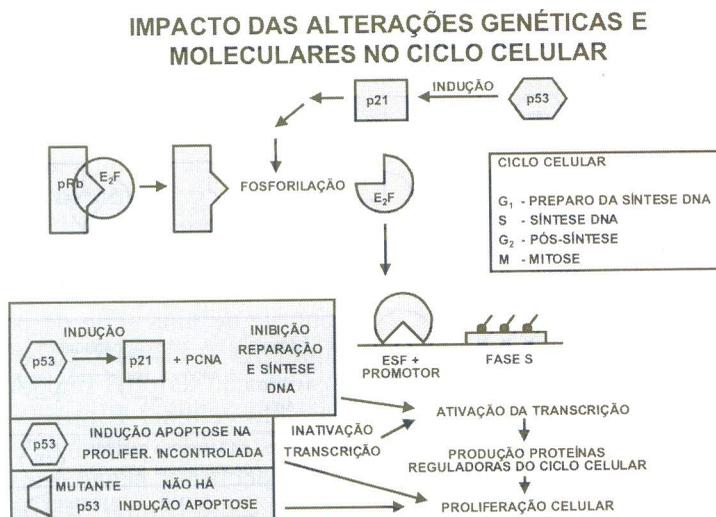


Figura 3

zados na **FIGURA 4**. Assim, é possível que com esforços conjuntos utilizando a terapia molecular gênica, bem como a redução nas

exposições ambientais, como por exemplo o cigarro, possam controlar epidemiologicamente o câncer de pulmão.

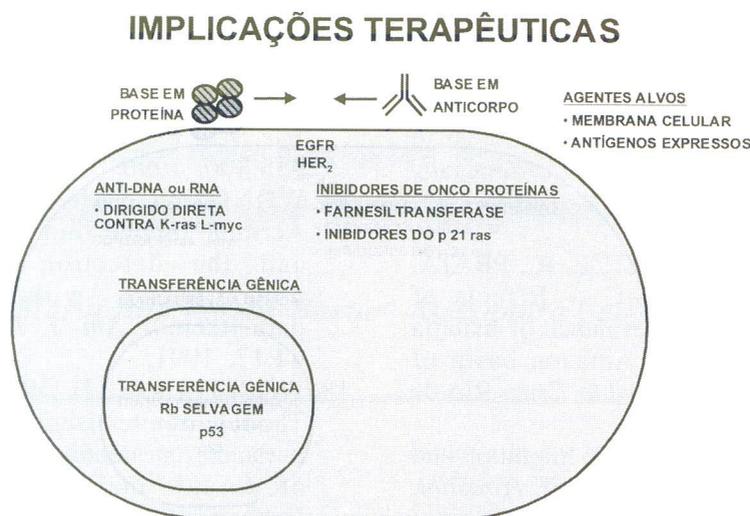


Figura 4

Capelozzi, V.L.: Genética do câncer de pulmão. *Rev Med, São Paulo*, 80(1):41-51, jan./fev./mar., 2001.

ABSTRACT: The lung cancer is one of the neoplasms of higher mortality. Biologically is the expression of the genetic alterations in the epithelial cells of the aerial ways. It is necessary to study the genetics and the pathology so that let us can arrive the best responses about the treatment, diagnosis and evolution of the disease.

KEYWORDS: Lung Neoplasms/pathology; Lung Neoplasms/genetics; Oncogenes/genetics; Mutation; Cell Cycle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVILA, S.L.M.; LEANDRO, M.C.; CARVALHO, N.B. et al. – Evaluation of different methods for Plasmodia detection, in well defined population groups in an endemic area of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **36**:157, 1994.
2. BARATA, L.C.B.; BOULOS, M. & DUTRA, A.P. – Emprego da associação tetraciclina e quinino no tratamento da malária causada pelo Plasmodium falciparum. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **19**:135, 1986.
3. BOULOS, M. – Clínica de la infección malarica. *In Diagnóstico de malaria*. Publicación científica N° 512. OPS. Washington, 1988.
4. BOULOS, M. – Malária. *In Amato Neto, V. & Baldy, J.L.S. (Ed.): Doenças Transmissíveis*. 3ª ed. Sarvier. São Paulo, 1989.
5. BOULOS, M. – Clinical picture of severe malaria. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **34** (suppl. 9):S41, 1992.
6. BOULOS, M.; AMATO NETO, V.; DUTRA, A.P. et al. – Análise da frequência de recaídas de malária por *P. vivax* em região não endêmica (São Paulo, Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **33**:143, 1991.
7. BOONPUCKNAVIG, V. & SITPRIJA, V. – Renal disease in acute Plasmodium falciparum infection in man. *Kidney Intern.*, **16**:44, 1979.
8. CRANE, G.G. – Hyperreactive malarious

- splenomegaly (tropical splenomegaly syndrome). *Parasitol. today*, **2**:4, 1986.
9. Fundação Nacional da Saúde - Avaliação epidemiológica da malária, segundo o local de diagnóstico, Brasil, 1998 e 1999. Documento, junho de 2000.
 10. GRAU, G.E.; PIGUET, P.F. & LAMBERT, P.H. - Immunopathology of malaria: role of cytokine production and adhesion molecules. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **87** (suppl. V):95, 1992.
 11. MCGREEVY, P.B.; DIETZE, R.; PRATA, A. & HEMBREE, S.C. - Effects of immigration on the prevalence of malaria in rural areas of the Amazon basin of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **84**:485, 1989.
 12. MARQUES, A.C. - Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol. today*, **3**:166, 1987.
 13. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD - Epidemiologia y control de la malaria causada por *P. falciparum* en las Américas. Publicación Científica N° 471. Washington, 1984.
 14. REY, L. - Parasitologia. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1973.
 15. WHITE, N.J. - Clinical and pathological aspects of severe malaria. *Acta Leidensia*, **56**:27, 1987.
 16. WHITE, N.J. - The treatment of malaria. *The New England Journal of Medicine*, **335**:800, 1996.
 17. WONGSRICHANALAI, C. et al. - Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in populations with low-density parasitaemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **44**:17, 1991.
 18. WORLD HEALTH ORGANIZATION. - The role of artemisinin and its derivatives in the current treatment of malaria. Report of an informal consultation. WHO, Geneva, 1994-1995.

Recebido para publicação em 02.2001

Aceito para publicação em 03.2001