

ARTIGO DE REVISÃO/REVISION ARTICLE

Biologia do cancro do pulmão: conceitos actuais

Lung cancer biology: an update

RENATO SOTTO-MAYOR*

* Assistente Hospitalar Graduado de Pneumologia do Hospital de Santa Maria.
Assistente Convidado da Faculdade de Medicina de Lisboa.

RESUMO

No presente artigo de revisão o autor relata os conhecimentos actuais sobre a biologia celular e molecular do cancro do pulmão, relacionando-os, sempre que possível, com as respectivas implicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

REV PORT PNEUMOL 2002; VIII (6): 655-679

Palavras-chave: Cancro do pulmão; biologia celular; biologia molecular; transformação maligna; progressão tumoral; metastização.

ABSTRACT

In this revision article the author states about the cellular and molecular biology of lung cancer and his relation with the diagnosis, evolution, prognosis and therapeutics of the disease.

REV PORT PNEUMOL 2002; VIII (6): 655-679

Key-words: Lung cancer; molecular biology; cellular biology; malignant transformation; tumoral progression; metastatic spread.

Recebido para publicação: 02.09.19

Aceite para publicação: 02.10.21

INTRODUÇÃO

O cancro do pulmão é uma das neoplasias malignas mais frequentes e letais da humanidade, sendo fundamental que a sua *biologia* seja intimamente compreendida, de modo que, com novas abordagens diagnósticas e terapêuticas, se possa ultrapassar o espectro negativo que o seu diagnóstico ainda acarreta ^{3,7,24,26,38,83,86,97,100}.

Foram descritas múltiplas anomalias nas células do carcinoma brônquico, estando no início a compreensão da sua *biologia celular e molecular* ^{21,38,86,87,91,107}.

O cancro do pulmão está associado a alterações genéticas, apresenta um ADN extremamente instável, parece ter uma origem unicelular e um progenitor comum, revela uma heterogeneidade intratumoral marcada, e a sua progressão pode ser vista como um processo dinâmico de divergência clonal que, num contexto de selecção ambiental, dá origem a um conjunto de subpopulações celulares altamente adaptadas e fenotipicamente agressivas, algumas das quais têm capacidade de metastização ³⁸.

A nível *molecular* podem apontar-se aberrações cromossómicas, expressão de oncogenes dominantes ou perda de oncogenes recessivos/genos supressores tumorais, e a nível *celular* descrevem-se anomalias nos factores de crescimento ou nos epítopes da superfície celular ^{87,91}.

Uma área aliciente diz respeito ao estudo dos mecanismos de metastização, os quais envolvem a interacção das células malignas com a matriz extracelular, alterações na adesão das células, produção de proteinases, intravasão e extravasão do sistema circulatório, colonização em locais distantes do tumor primitivo, e angiogénese ^{38,87}.

ANOMALIAS A NÍVEL DA BIOLOGIA MOLECULAR

Conceitos gerais

Para que a célula normal se torne neoplásica terão que ocorrer várias alterações/mutações, num contexto genético e epigenético ainda não completamente compreendido. A neoplasia maligna irá resultar da acumulação de anomalias dos genes, que afectam o crescimento e a diferenciação das células segundo um processo multifaseado que culmina no fenótipo maligno. Estatisticamente, ocorrerão 3 a 12 alterações genéticas e epigenéticas até que a neoplasia se revele clinicamente ⁷⁹.

Esses genes incluem os *protooncogenes*, como os da família *ras*, que são componentes de vias que transmitem sinais da superfície celular para o núcleo (sinais de transdução), sabendo-se que anomalias verificadas a esse nível levam à sua conversão em oncogenes e determinam a desregulação do crescimento das células; *genes supressores tumorais*, que impedem a progressão do ciclo celular; *genes envolvidos na regulação do ciclo celular*; e *genes implicados na reparação do ADN* ^{21,41}.

De acordo com os conceitos actuais de *carcinogénese*, anomalias genéticas individuais não levam, só por si, ao cancro, mas determinam desregulação do crescimento celular, aumentando a probabilidade de ocorrerem alterações genéticas adicionais, as quais podem, eventualmente, culminar na emergência do cancro ⁴¹.

É possível que possam ocorrer múltiplas anomalias moleculares síncronas, em resposta à agressão de toxinas, como as que estão presentes no fumo do tabaco (Quadro I) ^{40,82,99}, que vão transformar a célula

QUADRO I

Fumo do tabaco*: Carcinogénios**

Carcinogénios	Agentes modificadores (↑)
<p>Forte evidência</p> <ul style="list-style-type: none"> – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Benzopirenos, fluoretanos e outros) – Nitrosaminas e aminas aromáticas <p>Fraca evidência</p> <ul style="list-style-type: none"> – Po₂₁₀, Cr, Cd, Ni – Aldeídos, butadieno – Radicais livres 	<p>Co-carcinogénios (Catecóis)</p> <p>Promotores tumorais (Fenóis e outros)</p> <p>Aldeídos tóxicos (Acroleína)</p> <p>Dieta rica em gorduras</p>

* 4000 produtos químicos; ** 60 carcinogénios respiratórios

pulmonar normal em célula cancerosa.

As células alvo da transformação neoplásica encontram-se rodeadas por outras células e por matriz extracelular. A matriz extracelular e múltiplas moléculas existentes em circulação vão comunicar com aquelas células por intermédio de receptores (como os receptores para os factores de crescimento), de moléculas de adesão (como as caderinas), e de integrinas. Quando um sinal de transdução atinge a célula, são activadas diferentes vias, que culminam em alterações dramáticas que podem afectar o citoesqueleto, a morfologia e a migração. Eventualmente, aquele sinal pode ser transmitido ao núcleo e dá-se a activação ou a supressão de certos genes, o que determina a transformação maligna⁸⁷.

Nesta altura ocorrem alterações nos mecanismos homeostáticos internos da célula neoplásica e no microambiente envolvente, a população celular maligna multiplica-se e pode metastizar e colonizar locais distantes. Para que tal suceda tem que dar-se invasão local, com alterações na adesividade das células tumorais, produção de proteinases, mobilização das células, intravasão e extravasão do sistema circulatório, implantação em locais distantes e angiogénese nesses pontos de colonização.

O conhecimento de anomalias moleculares genéticas, específicas de determinadas neoplasias

malignas, tem potencialidades clínicas ainda não exploradas na prática diária, como o diagnóstico precoce em indivíduos de alto risco para o cancro do pulmão pela pesquisa dessas anomalias na expectoração ou no líquido de lavagem broncoalveolar dos doentes, como indicador de recidiva em doentes com carcinoma pulmonar não de pequenas células (CPNPC) operados em estádios I ou II, como orientador de terapêuticas adjuvantes à cirurgia, na selecção da terapêutica mais activa na doença localmente avançada ou metastática, na detecção da recorrência tumoral após uma terapêutica oncostática eficaz, como factor de prognóstico biológico, ou como suporte à terapêutica génica^{21,107}.

Anomalias cromossómicas. Activação das telomerasas

No cancro do pulmão, têm sido descritas várias anomalias cromossómicas. Nos CPNPC, referem-se aberrações cromossómicas em 3p, 8p, 9p, 11p, 15p e 17p, com deleções cromossómicas 7, 11, ou 19, e nos carcinomas pulmonares de pequenas células (CPPC) – que, contrariamente ao que acontece com a maior parte daqueles, manifestam características

neuroendócrinas — indicam-se anomalias cromossómicas em 1p, 3p, 5q, 6q, 8q, 13q ou 17p²⁰.

Uma das primeiras constatações citogenéticas no cancro do pulmão reportou-se ao achado frequente de deleções cromossómicas na região 3p14-23 no grupo dos CPPC, que se estendeu posteriormente aos CPNPC^{74,86,116}. A deleção do braço curto do cromossoma 3 [3p(14-23)] é uma das anomalias cromossómicas mais consistentes no cancro do pulmão^{37,42,102}, encontrando-se perda de alelos em 3p, em mais de 90 % dos CPPC e em cerca de 50 % dos CPNPC^{74,86}.

As deleções do braço curto do cromossoma 3 são eventos críticos na patogénese do cancro do pulmão, tendo sido demonstrado que as perdas de alelos ocorrem em fases muito precoces, em estádios pré-neoplásicos, em situações de hiperplasia epitelial, de displasia e de carcinoma *in situ*^{82,91,102}. Além disso, as deleções citogenéticas do braço curto do cromossoma 3 foram detectadas em mucosa brônquica aparentemente normal, localizada em pontos distantes do tumor, por vezes em múltiplas lesões distribuídas pelo epitélio respiratório dos brônquios, bronquíolos e alvéolos, e a sua persistência tem sido relacionada com a evolução da doença¹⁰².

A observação de alterações 3p em lesões pré-invasivas dos brônquios sugere que um ou mais genes supressores tumorais poderão funcionar como protectores face à carcinogénese brônquica, e é consistente com a evolução multifaseada desta mesma, perante a agressão crónica de carcinogénios como os que constituem o fumo do tabaco, do que resulta a possibilidade de se desenvolverem focos neoplásicos múltiplos e separados^{82,91,102}. Os ensinamentos destas constatações poderão contribuir para o diagnóstico precoce do cancro do pulmão, incluindo em material esfoliado a partir da árvore brônquica^{27,102}.

Na patogénese dos CPPC poderão estar envolvidos, pelo menos, 3 genes supressores tumorais⁸⁷. Recentemente, o gene FHIT (*fragile histidine triad*) foi localizado em 3p14.2, tendo-se verificado que cerca de 80 % dos CPPC e de 40 %

dos CPNPC revelam alterações desse gene^{102,104}. A sua perda pode provocar a estimulação da síntese e da proliferação de ADN. Deste modo, o gene FHIT poderá representar um dos potenciais genes supressores tumorais localizados no cromossoma 3p, que estão envolvidos na patogénese dos CPPC e dos CPNPC, dada a sua especial susceptibilidade a alterações induzidas pelos produtos químicos do fumo do tabaco^{87,102}.

O gene FHIT parece ser um alvo preferencial da agressão tabágica a nível molecular⁸², podendo vir a ser utilizado como marcador de lesão precoce em grupos de risco para o cancro do pulmão, como os dos grandes fumadores, e constituir fonte futura de intervenção com fins terapêuticos, à semelhança do que já está a ser estudado com a p53^{27,83,84}.

Embora com menor consistência, têm sido descritas outras alterações genéticas. Nos CPNPC refere-se a perda do cromossoma 8p (21.3-22) em cerca de 50 % das amostras estudadas^{71,86}. Perdas genéticas em 9p (21-22) poderão envolver os genes supressores tumorais p16 (MTS1/p16^{INK4A}) e p15 (MTS2/p15^{INK4B}), o que ocorre em 67 % dos casos^{65,92}. Perdas genéticas em 11p (p13 e p15) podem envolver o gene supressor do tumor de Wilms na região p13, o que pode afectar 20-46% das amostras²⁸. Os CPPC revelam perdas pouco frequentes em 9p, mas mais que os CPNPC em 3p, 5q, 13q e 17p⁷⁴.

Os telómeros são elementos genéticos importantes na estabilidade e fidelidade da replicação dos cromossomas. Os mais longos são encontrados nas células germinativas e na maior parte das células cancerosas, por via do enzima telomerase, o que provavelmente explica a capacidade destas células se multiplicarem indefinidamente^{12,21,82,86}.

A actividade das telomerasas tem sido relacionada directamente com o fenotipo maligno e metastático num largo conjunto de tumores sólidos, incluindo os carcinomas brônquicos^{39,82}. É necessária a reactivação da expressão das telomerasas para que se dê a proliferação contínua e a imortalidade das células cancerosas, podendo a sua desregulação ocorrer nas displasias epiteliais brônquicas pré-neo-

plásticas, o que pressupõe o seu envolvimento em fases precoces da carcinogénese brônquica⁸². Ao medir a actividade das telomerasas no cancro do pulmão, constata-se que cerca de 100 % dos CPNC e 80-85 % dos CPNPC são telomerase-positivos⁵⁵.

Uma alta actividade das telomerasas foi associada a um alto índice de proliferação celular e a estádios anatómicos mais avançados de CPNPC². Por outro lado, a actividade das telomerasas e/ou a expressão da componente ARN das telomerasas humanas estão frequentemente desreguladas no carcinoma *in situ*, o que é mais um argumento a favor do seu envolvimento precoce no processo multifásico da carcinogénese brônquica¹¹⁸.

Dado que a activação das telomerasas é essencial para o crescimento a longo prazo de muitas neoplasias malignas, é aliciante postular-se que a sua inibição poderá constituir um importante alvo terapêutico^{87,91}. Também poderá constituir um marcador de cancro do pulmão^{21,91}.

Oncogenes e genes supressores tumorais

Os marcadores moleculares genéticos estão a ser intensamente estudados no cancro do pulmão, podendo vir a ter importância clínica em várias áreas, a saber^{27,49}: com fins diagnósticos, na suspeita de cancro do pulmão, podendo fazer-se a sua pesquisa em produtos de biópsias, em fluidos, como o líquido de lavagem broncoalveolar, ou na expectoração; no rastreio de cancro em indivíduos assintomáticos; para melhor caracterização do estadiamento patológico da doença, ao permitir a detecção de micrometástases; com fins prognósticos, baseando-se na presença ou ausência de determinadas anomalias genéticas específicas; para o diagnóstico precoce de uma recidiva tumoral, após a instituição da terapêutica; na definição de candidatos a terapêuticas adjuvantes; para implementação de novos alvos terapêuticos.

Foram descritas quatro categorias de genes cujas

QUADRO II

Anomalias genéticas e moleculares no cancro do pulmão

Genes	Mutação	Expressão anormal (%)	
		CPNPC	CPNC
Oncogenes			
<i>K-ras</i>	Mutação pontual	30	NR
<i>myc</i>	Amplificação do ADN	10	10-40
<i>c-erbB-2</i>	Aumento da expressão	25	NR
<i>bcl-2</i>	Expressão da proteína	25	NR
Genes supressores tumorais			
3p	Delecção	50	90
Rb	Delecção, expressão alterada da proteína, fosforilação	15	>90
p53	Delecção, mutação pontual, aumento da expressão	50	80
p16 ^{INK4A}	Expressão da proteína	60	NR

NR- não referenciada

anomalias podem relacionar-se com o cancro do pulmão, os *oncogenes dominantes*, os *genes supressores tumorais*, os *genes do metabolismo carcinogénico* e os *genes da resistência à quimioterapia* ^{17,26}.

Tem sido investigada uma variada expressão oncogénica nos CPNPC e CPPC, que incide sobre as duas formas de oncogenes descritas, os *oncogenes dominantes* e os *genes supressores tumorais* ^{17,86,91}.

Os oncogenes dominantes, como *ras*, *myc*, *Her-2/neu* ou *bcl-2*, exercem o seu efeito ultrapassando a função do crescimento celular normal, enquanto os oncogenes supressores tumorais o fazem controlando aquele crescimento. Uma vez na presença de deleção de oncogenes supressores tumorais como p53, Rb, p16^{INK4A} e p15^{INK4B}, ou de genes do cromossoma 3, os mecanismos normais de controlo já não são possíveis

Nenhum dos genes foi implicado, em 100 % dos casos, na etiologia do cancro do pulmão (Quadro II) ⁸⁶.

O gene *K-ras* e os seus relacionados, os genes *N-ras* e *H-ras* têm localização cromossómica em 12p13 e codificam proteínas p21, que se ligam à camada superficial da membrana celular, têm actividade GTPase e estão envolvidas no sinal de transdução e na proliferação celular ^{17,21,41}.

As mutações *K-ras* são frequentes nos CPNPC, especialmente nos doentes fumadores, aparecendo em mais de 30-50 % dos casos de adenocarcinomas, não tendo sido descritas nos CPPC nem nos tumores carcinóides, pelo que deverão desempenhar um papel importante na formação dos adenocarcinomas do pulmão ^{27,41,86,91,115}. O aumento da sua expressão correlaciona-se com um decréscimo na sobrevida dos doentes, especialmente nos tumores ressecados ^{32,41,86,96}.

As mutações *ras* poderão afectar a resposta à quimioterapia e à radioterapia, conforme foi demonstrado experimentalmente ^{41,86}. Nos adenocarcinomas, em estádios avançados (III e IV), alguns autores não encontraram diferenças prognósticas na presença ou ausência de mutações *ras* ^{41,86}. Recen-

temente, neste grupo histológico foram descritas mutações *K-ras* nos tumores parenquimatosos mas não nos de localização brônquica ¹⁸.

Representarão um dos vários mecanismos envolvidos no processo multifaseado da carcinogénese brônquica e da metastização, ocorrendo desde a fase de displasia grave, não espantando terem sido encontradas vários anos antes da neoplasia se manifestar clínica e radiologicamente ^{41,86}. Esse facto tem estimulado estudos (do líquido de lavagem broncoalveolar, secreções brônquicas e expectoração) nos sentido da sua aplicação clínica, para se alcançar o diagnóstico precoce de cancro do pulmão em indivíduos assintomáticos mas, na prática, tal ainda não é rentável ^{27,41,82}.

Também se encontram em investigação estratégias de terapêutica génica (com ribozimas, inibidores da farnesil-transferase ou oligonucleótidos *antisense*) no sentido de inibir o crescimento tumoral interferindo com a expressão deste oncogene e respectiva proteína (p21) ¹⁶. O sinal de transdução é catalisado pela farnesil-transferase, cuja inibição poderá impedir o crescimento das neoplasias que se acompanham de mutações *K-ras*, o que está a ser testado em protocolos de investigação clínica com produtos como o SCH 66336 ou o Jansen C111577 ⁷.

Os oncogenes dominantes da família *myc*, *C-myc*, *N-myc* e *L-myc*, com localização cromossómica, respectivamente em 8q24, 2p23-24 e 1p32, estão comprometidos na regulação da transcrição ^{14,45,80}. O mecanismo geral de activação é a amplificação do gene, com o conseqüente aumento de expressão, sendo aquela amplificação um evento precoce no processo de desenvolvimento tumoral ^{17,86}. A sua anormal expressão é pouco frequente nos CPNPC (10 %) e variável nos CPPC (10 a 40 %) ^{86,87}. As anomalias do *N-myc* e do *L-myc* só costumam ocorrer nestes últimos, enquanto a activação do *C-myc* pode ser demonstrada tanto nos CPPC como nos CPNPC ^{16,91}. Nos CPNPC, o seu significado prognóstico tem sido motivo de discussão, podendo apresentar diferenças geográficas, parecendo que nos CPPC a amplificação do gene *C-myc* se acompanha de um

efeito negativo na sobrevida dos doentes^{17,87}. Tal com referido em relação aos oncogenes da família *ras*, também a sua inibição com estratégias de terapêutica génica poderá inibir o crescimento tumoral e das suas metástases, o que já foi demonstrado experimentalmente, nomeadamente quando em associação com fármacos como o *cisplatinum*¹⁶.

Contrariamente aos genes que sofreram mutações, deleções ou rearranjos, e que estão presentes nas células neoplásicas, os chamados genes de classe II, como os da família *myc*, não se encontram alterados a nível do ADN, mas afectam o fenótipo das células hospedeiras por compromisso da sua expressão²⁷. É possível a utilização destes genes como marcadores de células tumorais, mas requer um maior esforço, dado que tem de utilizar-se métodos quantitativos, não bastando a sua detecção qualitativa, como acontece com os primeiros²⁷. Um avanço poderá constituir a quantificação das alterações da expressão dos genes pela técnica *real-time* PCR, mas são necessários mais estudos para avaliar se tal terá algum impacto na detecção, monitorização e prognóstico dos carcinomas brônquicos²⁷.

O oncogene *c-erbB-1*, com localização cromossómica em 7p13, relaciona-se com o receptor do factor de crescimento epidérmico (EGF-R), que tem actividade tirosina quinase, enquanto o *c-erbB-2*, ainda conhecido por *Her2/neu*, com localização em 17q21, codifica o produto proteico p185^{neu}, também um receptor de factor de crescimento^{86,107}.

A expressão de EGF-R no cancro do pulmão, cujo significado prognóstico não está estabelecido (pior prognóstico nos *c-erb-1*⁺?), demonstra-se nos CPNPC (mesmo em lesões pré-malignas), predominando nos carcinomas epidermóides (86%), seguido dos carcinomas de grandes células (55%) e dos adenocarcinomas (50%), sendo de 0% nos CPPC¹⁶.

A expressão anormal de p185^{neu} não tem sido referida nos CPPC, ocorrendo em cerca de 25% dos CPNPC^{86,87}. O aumento de expressão de p185^{neu} tem sido relacionado com pior prognóstico nos adenocarcinomas do pulmão, assim como com o aumento

de resistência aos fármacos citostáticos^{16,46}. O aumento da expressão de *c-erbB-2* nas células do epitélio brônquico fornece-lhes vantagens proliferativas, pelo que poderá estar envolvido nas fases precoces do cancro do pulmão⁸⁶.

Tal como o EGF-R, a proteína p185^{neu} regula a adesão das células e a capacidade invasiva do tumor em associação com o complexo caderina-catenina e também contribui para a angiogénese¹⁶. Encontra-se em estudo a aplicação terapêutica do anticorpo monoclonal específico da proteína *Her2* (anticorpo monoclonal anti-*Her2*) o produto *trastuzumab* (Herceptin[®]), isoladamente ou associado à quimioterapia⁷.

O produto do oncogene *bcl-2*, que tem localização em 18q21 e é negativamente regulado pela p53, inibe a morte celular programada, isto é, a apoptose, pelo que as células que manifestam um aumento da sua expressão revelam um acréscimo da sua população^{16,51}. Deste modo, comporta-se como um regulador negativo da apoptose, enquanto a proteína *Bax* tem um efeito contrário¹⁶. Tem sido referido em lesões displásicas graves, sendo o padrão de *bcl-2* tanto mais aberrante quanto maior o grau da displasia¹⁶. Em cerca de 65% dos carcinomas brônquicos encontram-se células com expressão de *bcl-2*¹⁶.

O seu significado prognóstico ainda não está esclarecido, tendo sido referido que, num grupo de doentes com carcinomas epidermóides, a sobrevida foi melhor naqueles que apresentavam positividade tumoral para o *bcl-2* (*bcl-2*⁺), enquanto numa série de doentes com CPPC submetidos a quimioterapia a sobrevida foi inferior no grupo *bcl-2*⁺⁷⁶. Outro estudo referiu melhor prognósticos nos doentes com CPNPC que revelavam *bcl-2*⁺ (e ainda melhor nos estádios I e II), ou a associação *bcl-2*⁺ e p53⁻ (contrariamente ao que acontecia com os *bcl-2*⁻ e p53⁺; isoladamente a presença de p53 não se relacionou com a sobrevida)⁷². Outros autores referem o seu envolvimento nos mecanismos de resistência aos fármacos citostáticos e às radiações, estando a ser investigada a sua inibição com oligonucleótidos *antisense*, com fins terapêuticos¹⁶.

Outros oncogenes descritos no cancro do pulmão incluem: *c-fos*, *c-jun*, *c-myb*, que codificam factores de transcrição nuclear; *c-raf*, uma proteína citoplasmática; e *c-fms* e *c-src*, proteínas tirosinaquinase da membrana celular¹⁷. Em geral, o grupo histológico envolvido é o CPPC, e a anomalia do oncogene relaciona-se, predominantemente, com a sua expressão, referindo-se que o oncogene *raf-1* poderá ter uma importância especial no desenvolvimento daquele tipo de tumores pela sua localização no braço curto do cromossoma 3, no *locus* 3p25¹⁷.

No processo de desenvolvimento do cancro, em contraste com o ganho de função característico dos oncogenes, costumam perder-se as funções dos genes supressores tumorais, também chamados anti-oncogenes ou recessivos.

Vários genes supressores tumorais têm sido apontados como importantes no cancro do pulmão, podendo citar-se como mais relevantes o p53, o p16^{INK4}, o Rb (gene do retinoblastoma) e o FHIT²¹.

O gene p53, que se localiza em 17p13.1, codifica uma proteína nuclear que funciona como factor de transcrição e bloqueia a progressão celular intervindo no ciclo celular, tardiamente, na fase G1, sendo considerado como o *guardião do genoma*^{17,82,86,87}. Deste modo, a proteína p53 desempenha um papel crucial na modulação da resposta celular ao *stress* citotóxico, regulando a paragem do ciclo celular e a morte celular programada, sendo fundamental na estabilidade genética e na sobrevivência celular^{8,49,107}.

As alterações genéticas mais frequentemente relacionadas com o cancro dizem respeito a mutações do gene p53, que levam à perda da função supressora tumoral, à promoção da proliferação celular, a uma instabilidade genética e à inibição da apoptose^{8,49,86,91}. A inactivação do gene p53 demonstra-se pela perda de heterozigotia e por mutações no alelo restante⁵⁰.

Da desregulação da apoptose resulta um aumento da resistência à quimioterapia e à radioterapia, estando dependente de vários factores, incluindo a actividade pró-apoptótica do gene supressor tumoral p53 e do gene PTEN, e dos efeitos opostos do gene

bcl-2 e da família das proteína-quinases C^{7,101}. As mutações do gene p53 reflectem geralmente exposição a carcinogénios como os do fumo do tabaco^{8,82,91}.

A constatação de mutações do gene p53 em lesões pré-neoplásicas do pulmão e em amostras de expectoração de indivíduos ainda sem cancro do pulmão diagnosticado, aponta para a sua utilidade com potencial biomarcador na detecção precoce destas neoplasias malignas^{6,27}.

Cerca de 15-25 % dos doentes com cancro do pulmão desenvolvem anticorpos contra as proteínas p53 sugerindo que o aumento de expressão de proteínas p53 mutantes poderá determinar respostas imunes humorais do hospedeiro⁹¹.

A restauração da expressão da p53 pode contrariar o crescimento tumoral, induzir a apoptose e uma maior sensibilidade tumoral à radioterapia e à quimioterapia, o que tem sido testado em vários protocolos terapêuticos^{7,29,56,83,101,109,113,121}.

A frequência das mutações deste gene atinge os 45-75 % nos CPNPC e os 70-100 % nos CPPC^{82,95,101}, tendo-se referido, recentemente, que a elevada expressão da oncoproteína p53 poderá ser um factor de prognóstico favorável num subgrupo de CPNPC⁵⁴, o que veio contrariar a convicção de que a sua presença teria uma correlação negativa com a sobrevida dos doentes com cancro do pulmão^{27,69}.

A oncoproteína MDM2 inibe a função p53, sendo a o aumento da sua expressão, por amplificação do gene MDM2, mais vezes referida nos adenocarcinomas, o que se pode traduzir por uma discreta melhoria no prognóstico de doentes operados em estádios precoces¹⁶.

O gene Rb, localizado na região cromossómica 13q14.11, é importante na regulação do ciclo celular na fase G0/G1. Em mais de 90 % dos CPPC e em cerca 15-20 % dos CPNPC, existe deleção deste gene supressor tumoral, podendo a sua presença ser um sinal de mau prognóstico no cancro do pulmão, facto que não é consensual^{16,22,33,42,114,119}.

Certas células de cancro do pulmão apresentam uma deleção característica do cromossoma 9p21,

QUADRO III

Anomalias genéticas *major* no cancro do pulmão e sua relação com os grupos histológicos (Adaptado da referência ²⁶)

Anomalias	CPPC	CPNPC
Cromossoma 3p, perda de heterozigotia	++++	+++
Cromossoma 5q, perda de heterozigotia	+++	++
Mutação p16, associada a perda de heterozigotia 9p	-	++
Mutação p53, associada a perda de heterozigotia 17p	+++	++
Mutação Rb, associada a perda de heterozigotia 13q	+++	+
Amplificação <i>L-myc</i> , com ganho 1p	+	-
Amplificação <i>N-myc</i> , com ganho 2p	+	-
Amplificação <i>c-myc</i> , com ganho 8q	+	+

+ expressão mínima; ++ expressão moderada; +++ expressão elevada; ++++ expressão muito elevada; - sem expressão.

o que se relaciona com a presença, nesta região, de dois genes supressores tumorais importantes, conhecidos por p16^{INK4A} (CDKN2 ou MTS) e p15^{INK4B}. A sua frequência no cancro do pulmão é variável, tendo-se referido, em linhas celulares, uma correlação inversa entre a expressão de p16 e de Rb, o que pressupõe um papel importante destas proteínas na supressão do crescimento celular ^{75,82,87}.

A proteína p16^{INK4A} é um modulador do ciclo celular que parece regular a função de Rb, estando frequentemente alterada nos CPNPC e só muito raramente nos CPPC ⁹¹. Nestes tumores encontram-se mutações de Rb com p16 intacto, enquanto nos CPNPC se encontram alterações na expressão de p16 com Rb intacto ⁸².

Foi sugerido que as mutações p16^{INK4A} no cancro do pulmão poderiam relacionar-se com a progressão tumoral, pois descreveu-se uma maior frequência dessas alterações nos depósitos secundários do que nas lesões primitivas, mas ainda é controverso o seu significado prognóstico ⁹¹.

O gene FHIT, com localização cromossômica em 3p14.2, revela alteração da sua transcrição em 40 % dos CPNPC e em 80 % dos CPPC ²¹. Foi detectada perda de expressão da proteína Fhit em cerca de 50 % dos CPNPC, incluindo cancros em estádios muito precoces de fumadores e em lesões pré-neoplásicas, o que sugere um envolvimento muito precoce na

carcinogénese brônquica, mas o seu verdadeiro papel ainda está por esclarecer ²¹.

Outro gene supressor tumoral eventualmente comprometido na carcinogénese brônquica seria o DMBT1, com localização cromossômica em 10q25.3-q26.1, uma região em que se constata frequentemente perda de heterozigotia no cancro do pulmão ²¹. O mecanismo da sua inactivação ainda não está compreendido, mas aquela tem sido referida em CPNPC e em CPPC, pelo que se sugere que possa desempenhar um papel relevante no desenvolvimento do cancro do pulmão.

Como se pode inferir do que temos vindo a afirmar, existem diferenças a nível molecular entre os vários subtipos histológicos do cancro do pulmão.

Em termos gerais, os adenocarcinomas diferem dos carcinomas epidermóides pela maior percentagem de mutações *K-ras* (11-56 % vs 0-5 %) e de aumento de expressão *Her2/neu* (42-70 % vs 30 %), assim como pela menor frequência de mutações p53 (13-46 % vs 26-83 %) e de anomalias p16 (20-46 % vs 40-80 %) ¹⁰⁷. Os carcinomas de grandes células têm um perfil molecular intermediário entre os carcinomas epidermóides e os adenocarcinomas, excepto no que se refere às mutações do gene p53, que são mais frequentes nesse grupo histológico ¹⁰⁷.

A grande diferença molecular entre os CPNPC e os CPPC é a ausência de mutações *K-ras* nestes últi-

QUADRO IV
Alterações moleculares nos tumores pulmonares neuroendócrinos

Alteração	Carcinóide típico/atípico		Carcin. Neuroendócrino Grandes Células (CNEGC)	CPPC
Aumento de expressão p53	0 %	36 %	55 %	51 %
Mutação p53/perda de heterozigotia	0 %	14 %	52 %	79 %
Perda de expressão Rb	0 %	0 %	67 %	98 %
Perda de heterozigotia 3p	40 %	73 %	83 %	88 %

mos (15-30 % nos CPNPC), com a alta incidência de anomalias no gene Rb nos CPPC em relação aos CPNPC (90 % vs 15-30 %) ¹⁰⁷. Outra diferença refere-se à amplificação do gene *L-myc* nos CPPC (15-30%) ¹⁰⁷.

No que diz respeito aos tumores neuroendócrinos ⁹⁸, as anomalias moleculares vão-se tornando mais frequentes à medida que se caminha dos carcinóides típicos para os atípicos, destes para os carcinomas neuroendócrinos de grandes células (CNEGC) e, finalmente, para os CPPC (Quadro IV) ¹⁰⁷.

A expressão do gene Rb, determinada por métodos imuno-histoquímicos, pode revelar-se um útil adjuvante diagnóstico à microscopia óptica, pois está ausente em grande parte dos CPPC e CNEGC e presente na grande maioria dos carcinóides típicos e atípicos (Quadro IV) ¹⁰. De modo semelhante, o aumento de expressão de p53 não é observado nos carcinóides típicos, sendo progressivamente mais frequente nas formas mais agressivas de tumores neuroendócrinos ⁷⁷. Os carcinóides atípicos que mostram um aumento de expressão desse gene têm um pior prognóstico ⁷⁷.

Mutações pontuais do gene p53 poderão ser úteis para distinguir tumores pulmonares metácrone de lesões metastáticas, pois aquelas mutações são específicas dos tumores e encontram-se conservadas nas suas metástases ¹⁰⁷. Sabe-se também que os tumores que revelam aquelas alterações são sensíveis à acção do taxóide paclitaxel, enquanto outros agentes citostáticos não se mostram activos nesses casos, pelo que a sua caracterização poderá ter utilidade na definição da terapêutica a propor ^{44,107}.

Uma das principais razões da falência terapêutica nos carcinomas pulmonares é a emergência da resistência aos fármacos citostáticos, que nos CPPC costuma ser adquirida enquanto nos CPNPC é habitualmente inata, constatando-se em qualquer um dos grupos histológicos que, mesmo após resposta a uma terapêutica de primeira linha, aquela resistência costuma revelar-se na recidiva tumoral.

Existem várias razões plausíveis para esse facto, podendo uma delas estar relacionada com a expressão do gene da multirresistência aos fármacos (MDR1), o que tem sido demonstrado *in vitro*, mas *in vivo* tem sido difícil correlacionar a sua expressão com a sensibilidade aos fármacos ^{26,81}. Outros mecanismos de resistência incluem uma capacidade aumentada de reparar o ADN, especialmente em caso de recidiva dos CPNPC, e o aumento de expressão da topoisomerase II, que é alvo de agentes como o etoposido e que é necessária à replicação do ADN ²⁶.

ANOMALIAS A NIVEL DA BIOLOGIA CELULAR

Anomalias dos factores de crescimento

Para além das anomalias dos oncogenes, temos que levar em consideração a importância dos factores de crescimento na biologia das células neoplásicas, os quais desempenham um papel cru-

cial na regulação da sua proliferação, diferenciação e morte, interferido ainda na neo-angiogénese^{26,91}.

Nos CPPC, as células neoplásicas produzem péptidos neuroendócrinos (neuropéptidos), como o péptido relacionado com a gastrina (GRP), respondendo a eles de um modo autócrino ou parácrino^{16,87}. Outros factores de crescimento anormais nos CPPC poderão incluir o factor de crescimento insulina-*like* (IGF), a angiotensina, a endotecina, a serotonina, a bombesina, a substância P, a substância K, a vasopressina e a transferrina^{16,26}.

Dado que produzem vários factores de crescimento, a inibição de um deles tem pouco significado no bloqueio da proliferação celular, pelo que estão a ser desenvolvidos antagonistas de largo espectro dos neuropéptidos, sobre os quais se depositam grandes esperanças na terapêutica dos CPPC⁹⁰.

Nos CPNPC, factores como o factor de crescimento epidérmico (EGF), o factor de crescimento insulina-*like* (IGF), o factor de crescimento derivado das plaquetas, e o factor de crescimento transformador a e b (TGF-a e TGF-b) poderão estar envolvidos na resposta anormal da célula neoplásica^{16,42,87}.

Alguns deles desempenham um importante papel na patogénese e na progressão do cancro do pulmão, mesmo em fases muito precoces como na de metaplasia e na de displasia^{16,26,42,82}, estando em estudo a sua inibição com fins terapêuticos, por exemplo, com inibidores dos receptores da tirosina quinase do factor de crescimento epidérmico (ZD 1839 ou OSI 774) ou com anticorpos monoclonais para o factor de crescimento epidérmico (IMC 225 ou ABX-EGF)⁷.

Todos os grupos histológicos de cancro do pulmão expressam receptores nicotínicos com propriedades de receptores de acetilcolina e uma variedade de receptores opióides capazes de produzirem péptidos opióides⁵⁹. Estes podem inibir o crescimento das células do cancro do pulmão e induzir apoptose⁶⁰. Embora a nicotina não pareça, por si só, estimular o crescimento da maioria das células do cancro do pulmão, pode antagonizar o efeito apoptótico dos opióides pelo que é possível que a nicotina inalada

com o fumo do tabaco possa desempenhar um papel na patogénese do cancro ao inibir a apoptose⁶⁰.

Epítopes da superfície celular

As células do cancro do pulmão apresentam diferentes epitopes da superfície celular, tendo havido, recentemente, a tentativa de agrupar os antígenos encontrados naquela superfície de um modo semelhante ao que se fez com os leucócitos. Como consequência, descreveram-se 15 agrupamentos para os anticorpos que reagem contra as células pulmonares normais e contra as células do cancro do pulmão (Quadro V)^{5,52,105,106}. Como exemplo, apontam-se as moléculas de adesão das células neuronais (NCAM), que se expressam nas dos CPPC e que foram incluídas no grupo 1 (CL-1)⁸⁷. Em termos gerais, as moléculas de adesão são importantes na comunicação intercelular e entre as células e a matriz extracelular, e num estado patológico poderão desempenhar um importante papel na invasão tumoral e no processo de metastização. Em alguns estudos, 100 % dos CPPC reagem com os anticorpos NCAM, enquanto só 9 % dos CPNPC o fazem⁴⁸.

As células do cancro do pulmão também podem exprimir antígenos do grupo sanguíneo ABH, o que parece ter significado prognóstico. A expressão do antígeno A do grupo sanguíneo parece conferir melhor prognóstico aos doentes com CPNPC⁵³. O antígeno H/Le^a/Le^b relaciona-se com o antígeno H do grupo sanguíneo, estando a sua expressão elevada em certos casos de cancro do pulmão⁸⁷. A expressão deste antígeno parece relacionar-se com a delecção dos antígenos A e B do grupo sanguíneo. Alguns estudos demonstraram que cancros em que essa delecção ocorre apresentam maior capacidade invasiva e, deste modo, pior prognóstico⁶⁶, o que não é corroborado por outros⁶⁴.

Segregados pelas células e lançados para a circulação, alguns desses antígenos poderão servir para o serodiagnóstico, para a monitorização da

QUADRO V
Antigénios de superfície no cancro do pulmão

Grupo (CL)	Descrição
• CL-1	- Molécula de adesão das células neuronais (NCAM). Glicoproteína presente na maior parte dos CPPC e em alguns CPNPC. Marcador neuroendócrino (NE).
• CL-1C	- Intracelular. Presente em CPPC. Marcador NE.
• CL-2	- Glicoproteína epitelial. Presente em neoplasias epiteliais como CPNPC ou CPPC.
• CL-4	- Antigénio de activação leucocitária. Encontrado no CPPC.
• CL-5A	- Sialoglicoproteína. Presente em cerca de 50% dos CPPC (não nos CPNPC).
• CL-6	- Glicolípido LE ^y . Nos CPPC/CPNPC.
• CL-W7	- Mucina de alto peso molecular. Presente no CPNPC.
• CL-8	- Mucina de alto peso molecular. Presente no CPNPC.
• CL-9	- Mucina. Presente nos tecidos epiteliais. Presente nos CPPC e CPNPC.
• CL-10	- Proteína neuroendócrina específica. Marcador NE. Presente nos CPPC.
• CL-11	- Proteína de superfície celular (40 KD). Presente nos CPNPC.
• CL-12	- Receptor do ácido fólico. Presente nos CPNPC.
• CL-14	- Receptor EGF, p185 ^{neu} . Presente nos CPNPC.
• CL-W15	- Antigénio das células mesoteliais. Presente nos CPNPC.

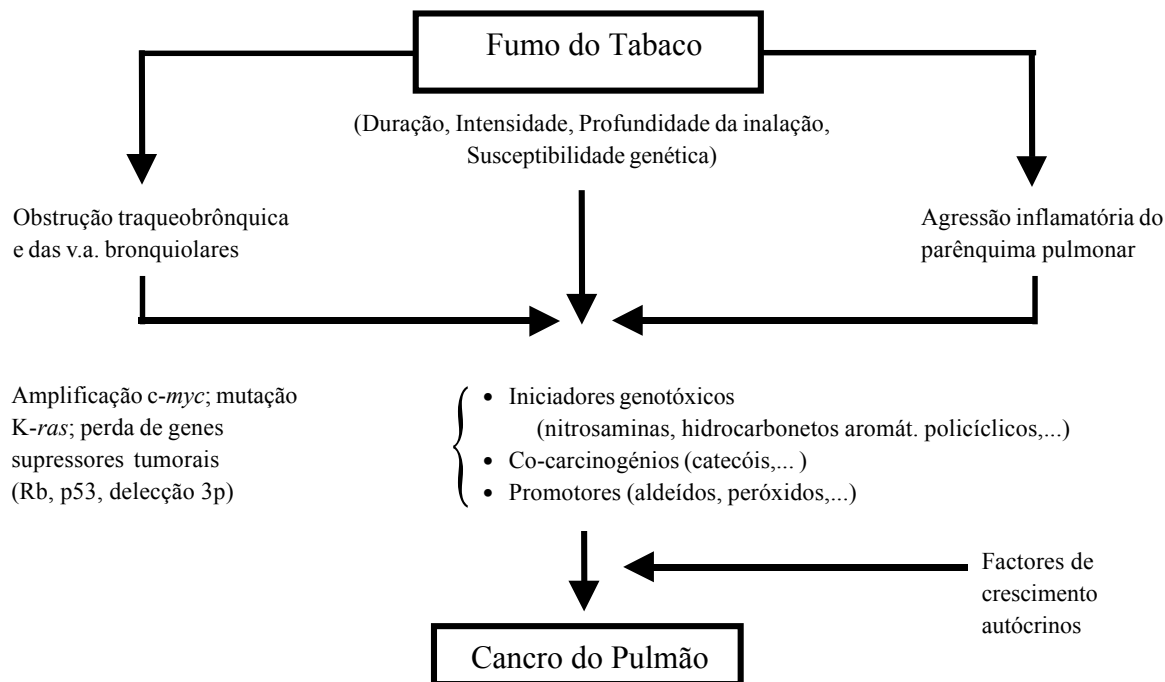
resposta à terapêutica ou, mesmo, como alvos terapêuticos^{5,9}.

Algumas síndromes paraneoplásicas neurológicas descritas no cancro do pulmão podem ser devidas a reacções autoimunes partilhadas entre os antigénios tumorais e o SNC, como é o caso da síndrome de Eaton-Lambert que ocorre no CPPC^{52,80}.

Marcadores tumorais

Os *marcadores séricos* do cancro do pulmão incluem hormonas, fetoproteínas, antigénios da membrana da superfície celular e enzimas, sendo úteis no estadiamento e no *follow-up* da doença. Uma descida no nível sérico do biomarcador acompanha,

QUADRO VI
Tabaco e cancro do pulmão



em geral, a resposta à terapêutica, enquanto uma subida pode anteceder, em meses, uma recidiva tumoral.

O CEA (antigénio carcinoembrionário) e o CA-125, são particularmente úteis no cancro do pulmão⁸⁷. Num estudo, foi demonstrado o aumento de ambos os marcadores em metade dos doentes com CPNPC ou CPPC⁸⁸. A neuroenolase específica (NSE) e a cromogranina-A, marcadores de diferenciação neuroendócrina, são mais úteis nos CPPC⁴³. Outros marcadores, que se têm revelado de interesse, em casos particulares, incluem hormonas (como a ACTH ou a HAD), o CA 19-9, o antigénio polipéptido tecidual (TPA), o Cyfra 21-1, o SCC, ou as moléculas de adesão da superfície das células neuronais (NCAM)⁸⁷. Alguns deles revelam valor prognóstico no cancro do pulmão, especialmente se apresentam valores elevados na altura do diagnóstico⁸⁵.

Tem sido estudada a importância da detecção e quantificação de alterações genéticas nas células epiteliais localizadas no tracto respiratório, medula óssea, sangue periférico ou gânglios linfáticos, como eventuais *marcadores moleculares* de cancro do pulmão e/ou de suas (micro)metástases e do respectivo impacto no diagnóstico, monitorização e prognóstico²⁷, discussão que fazemos, quando oportuno, em diferentes locais deste capítulo.

TRANSFORMAÇÃO MALIGNA

No cancro do pulmão, a *transformação maligna* é um acontecimento adquirido, devendo ocorrer entre 10 a 20 mutações somáticas para que ela se efective^{8,114}. Os *carcinógenos* (agentes responsáveis

pela lesão do genoma) e os *mutagénios* (agentes responsáveis por alterações genéticas), em conjugação com uma reparação mal sucedida e uma replicação desregulada, determinam a acumulação de rearranjos do genoma e, eventualmente, a emergência do fenótipo maligno³⁸. Aquela transformação é determinada por uma acumulação sequencial de múltiplas alterações genéticas, que envolvem genes cujos produtos proteicos são cruciais no controlo da proliferação celular e na apoptose⁸.

O pulmão está continuamente exposto a uma série de carcinogénios e mutagénios, pelo que apresenta uma grande probabilidade de sofrer múltiplas agressões genéticas. Dentre os agentes mais frequentemente apontados, contam-se o radão, os asbestos e o tabaco, sendo este último o responsável por cerca de 85 %-90 % das neoplasias malignas broncopulmonares^{19,82}. Contudo, só 15-20 % dos grandes fumadores vêm a sofrer de cancro do pulmão, o que faz supor uma predisposição genética individual para que isso aconteça, especialmente quando temos em atenção os grupos etários mais jovens²⁶.

Cerca de 50 % dos novos casos de cancro do pulmão ocorre em ex-fumadores, que mantêm um risco maior para aquela neoplasia do que os não fumadores^{91,110}. De facto, as alterações genéticas induzidas pelo fumo do tabaco podem permanecer por longos períodos de tempo, sendo responsáveis pelo cancro do pulmão no grupo dos ex-fumadores^{61,117}. A cessação tabágica relaciona-se com uma redução de todos os grupos histológicos de cancro do pulmão, com uma maior redução dos CPPC e dos carcinomas epidermóides, sendo este efeito mais marcado em grandes fumadores, particularmente no sexo feminino⁴⁷.

O fumo do tabaco é constituído por uma variedade imensa de produtos nos quais se incluem carcinogénios, co-carcinogénios e promotores tumorais (Quadro VI).

Existe uma predisposição genética para o início e manutenção do hábito de fumar, que se soma às bem conhecidas influências sociais. Em estudos epidemiológicos, encontrou-se uma forte relação entre o hábito tabágico e uma localização genética no cromossoma

5q, e uma fraca relação entre aquele hábito e uma localização genética no cromossoma 4²⁵. No que diz respeito ao polimorfismo do gene do receptor D2 da dopamina e à sua eventual relação com os hábitos tabágicos, os estudos são contraditórios, pelo que é prematuro tirar conclusões definitivas²⁶.

A predisposição genética para o cancro do pulmão tem sido referenciada em genes localizados no braço curto do cromossoma 3, no cromossoma 13q (*locus* retinoblastoma) e no braço curto do cromossoma 17⁷⁸.

Descrevem-se mais de 60 carcinogénios no fumo do tabaco, sendo indicados como especialmente importantes os da classe das nitrosaminas e dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos^{40,82}. Para exercerem os seus efeitos carcinogénicos, em geral, necessitam submeter-se a uma *activação metabólica*, que corresponde a parte da resposta do organismo à exposição a compostos estranhos, a qual também inclui a *destoxificação metabólica* que leva à sua eliminação e excreção (Quadro VII). Um aumento da componente relacionada com a activação metabólica e uma diminuição da que se refere à destoxificação relaciona-se com um maior risco para o cancro do pulmão.

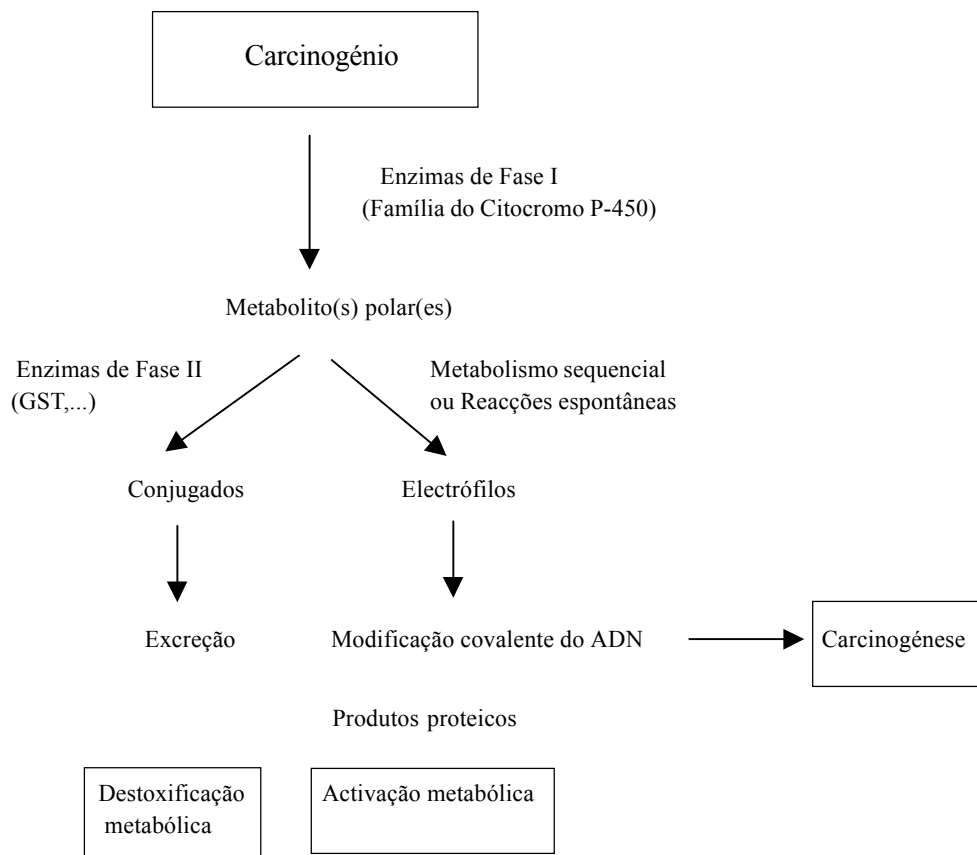
As nitrosaminas, produtos derivados da nicotina, são os carcinogénios mais abundantes no fumo do tabaco, sendo activadas pelo sistema enzimático do citocromo P-450³⁶. A sua acção sobre o ADN é responsável pelo aumento de mutações verificadas numa larga percentagem de células epiteliais do tracto respiratório dos fumadores³⁰. Pela acção de enzimas, as nitrosaminas podem formar conjugados e serem excretadas do organismo¹⁷.

Os hidrocarbonetos policíclicos, benzopireno e antraceno, constituem outra classe de carcinogénios encontrados no fumo de tabaco, que sendo activados pelo sistema P-450 vão lesar o ADN, determinando mutações nos oncogenes da família *ras* e no gene supressor tumoral p53, eventos *major* no processo multifaseado da carcinogénese brônquica^{101,112}.

Um possível factor contributivo para o aumento do risco de cancro do pulmão, em familiares de doentes com aquela neoplasia, diz respeito às anomalias herdadas dos genes relacionados com o

QUADRO VII

Activação e destoxificação metabólica dos carcinogénios



metabolismo do fumo do tabaco, a que chamámos, atrás, *genes do metabolismo carcinogénico* ^{11,17}.

Os carcinogénios representados pelos hidrocarbonetos policíclicos do fumo do tabaco podem ser activados, como vimos (Quadro VII), pelo sistema do citocromo P-450, ou destoxificados pelo sistema da glutatião-S-transferase (GST) ¹⁷.

A expressão do gene citocromo P450CYP1a1, também conhecido por gene aril-hidrocarbono-hidroxilase (AHH), é induzido pelo fumo do tabaco, o que foi comprovado experimentalmente em linhas celulares de cancro do pulmão, tendo-se relacionado os seus níveis com o aumento de alterações do ADN e com pior prognóstico dos doentes ⁶³.

O aumento do risco para o cancro do pulmão também foi relacionado com a alta actividade do citocromo P450CYP2D6, o que é conhecido pelo *fenotipo debrisoquina* ¹¹. Este citocromo metaboliza vários fármacos, incluindo antidepressivos tricíclicos, betabloqueantes e o agente anti-hipertensivo debrisoquina ¹⁷. Os metabolizadores pobres, que apresentam baixa expressão do enzima, podem revelar reacções significativas àqueles agentes farmacológicos, enquanto os bons metabolizadores, em que os níveis enzimáticos são elevados, apresentam um risco quatro vezes maior de sofrerem de cancro do pulmão ¹¹.

Pelo contrário, o sistema GST destoxifica o fumo de tabaco ao permitir a conjugação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com o glutatião, formando, deste modo, metabolitos hidrossolúveis inactivos¹⁷. Os polimorfismos do sistema GST podem aumentar cerca de 1000 vezes a variabilidade da actividade enzimática, sabendo-se que os fumadores que apresentam altos níveis de actividade enzimática têm baixo risco para o cancro do pulmão, quando comparados com aqueles que mostram baixos níveis ou nenhuma actividade⁷⁰.

Em síntese, podemos dizer que existem diferenças individuais no que se refere ao risco para o cancro do pulmão nos fumadores, que se relaciona com o polimorfismo genético nas vias metabólicas dos agentes carcinogénicos⁹¹.

Os conhecimentos relacionados com os mecanismos de activação metabólica e de destoxificação têm implementado estudos clínicos no sentido de actuarmos na prevenção do cancro do pulmão com o recurso a *agentes bloqueantes*, que interferem com aqueles processos, ou com o recurso a *agentes supressores*, que permitem suspender ou reverter a carcinogénese brônquica uma vez iniciadas as lesões genéticas. Dos primeiros, podemos citar produtos como terpenos, isocianatos aromáticos, fenóis, indóis, flavonas, taninos, antioxidantes e compostos orgânicos de selénio, enquanto dos segundos se referem beta-carotenos, retinóides, vitamina A, inibidores das proteases, inibidores da cascata do ácido araquidónico, isocianatos aromáticos e compostos orgânicos e inorgânicos de selénio, estando por definir o seu interesse na prática médica.

A inalação de partículas da asbestos tem sido responsabilizada igualmente pela carcinogénese brônquica, tendo aqui o tabaco um efeito sinérgico incontestável, pelo incremento directo do índice de mutações, pela acção sobre os inibidores/promotores da carcinogénese e pelo aumento das lesões oxidativas do ADN¹⁷. O mesmo se poderá dizer do radão^{89,101}.

É actualmente aceite que o cancro do pulmão (CPNPC/CPPC) tem origem em clones que

emergem de uma única célula, sendo a heterogeneidade intratumoral consequência da instabilidade genética que acompanha os clones celulares subsequentes^{13,38}. Deste modo, tem-se provado que os tumores pulmonares síncronas se apresentam geneticamente diferentes, o que pressupõe a origem monoclonal distinta para cada um deles¹⁰³.

A *cronologia* dos eventos que acompanham a *transformação maligna*, que culmina no cancro do pulmão, ainda não se encontra estabelecida.

As etapas mais precoces do processo que leva à emergência do fenótipo maligno envolvem a activação de um protooncogene (em uma única mutação), que se transforma em oncogene, e/ou a anulação de um gene supressor tumoral (que requer a deleção de dois alelos)^{68,114}.

Dada a alta frequência com que se encontra a activação do oncogene *ras*, quer na fase precoce dos CPNPC, como nos estádios mais avançados, pensou-se que mutações daquele oncogene poderiam estar presentes nos estádios pré-malignos, o que não veio a comprovar-se, pelo que não representam um evento inicial no processo de transformação daquelas neoplasias¹⁰⁸. Contudo, as mutações do referido oncogene são incontestavelmente importantes no processo de transformação maligna destes tumores, nomeadamente nas suas fases precoces, encontrando-se presentes nos CPNPC em 35 % dos doentes fumadores, em 32 % dos ex-fumadores e em 10 % dos não fumadores¹¹⁵. Recentemente, têm sido referidas mutações *K-ras* na hiperplasia alveolar (adenomatosa) atípica, que é considerada como potencial lesão precursora dos adenocarcinomas⁹¹.

A perda alélica em 3p, constitui uma deleção presente em praticamente todos os CPPC e em 25-50 % dos CPNPC, incluindo nas lesões pré-neoplásicas, facto que sugere o seu envolvimento precoce na transformação maligna deste tumores^{38,102}. De facto, é considerada a alteração alélica mais precoce, seguida pela perda do alelo 9p, do alelo 17p (e mutação p53), do alelo 5q, e por mutações *ras*, o que pressupõe o envolvimento de um ou mais genes

supressores tumorais 3p como “porteiros” da patogénese do cancro do pulmão⁹¹.

O gene supressor tumoral FHIT, localizado no braço curto do cromossoma 3p(3p14.2), encontra-se associado ao tabagismo e ao cancro do pulmão, descrevendo-se deleções e mutações em fases muito precoces de lesões pré-neoplásicas do epitélio brônquico⁸².

As mutações p53 também foram descritas em lesões pré-malignas, em especial dos carcinomas epidermóides, nos tumores de fumadores e nos de trabalhadores em minas de urânio^{38,49,82,101}.

Com base em análises moleculares, constatou-se que, logo nas lesões neoplásicas precoces do pulmão, se podem encontrar células tumorais com mutações p53, descrevendo-se entre 0,1 e 1 % de células com p53 mutantes nas chamadas lesões pré-malignas¹⁰¹. Na fase de progressão tumoral, aquelas células vão sendo seleccionadas predominando no tumor, quando este se manifesta clinicamente¹⁰¹.

Concordante com o facto da carcinogénese ser um processo que se pode prolongar por longos anos, desde a agressão inicial da célula do epitélio brônquico, passando pelas diferentes etapas de hiperplasia, metaplasia, displasia (lesão pré-neoplásica que pode evoluir para carcinoma brônquico, em especial, carcinoma epidermóide; nos carcinomas brônquicos de localização periférica, como certos adenocarcinomas, a hiperplasia adenomatosa atípica comporta-se como lesão pré-neoplásica, embora ainda não tenha sido possível descrever a respectiva sequência⁵⁰), carcinoma *in situ* e cancro clínico, e com os dados que relacionam a p53 com a progressão tumoral, está a detecção serológica de anticorpos p53, muitos anos antes do diagnóstico clínico do cancro do pulmão^{91,101}.

Esse facto levou alguns autores a defenderem que a sua pesquisa, em indivíduos de risco para o cancro do pulmão, como grandes fumadores e/ou expostos a pneumopoluentes de risco, poderá constituir um novo e sensível marcador sérico para a detecção de lesões brônquicas pré-neoplásicas e microinvasivas^{57,111}. Em doentes com diagnóstico de cancro do pulmão

constatou-se a descida dos níveis séricos de anticorpos p53, relacionada com a resposta à terapêutica instituída, o que aponta para a sua eventual utilidade como marcador destas neoplasias malignas¹²⁰.

O aumento de expressão do gene *Her2/neu* e do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) pode ocorrer em condições normais e no epitélio brônquico displásico³⁸. Nas lesões displásicas que acompanham os adenocarcinomas do pulmão, tem sido encontrada aneuploidia, o que tem relevo neste contexto³⁸.

Apesar destas constatações, está por definir o exacto papel das alterações genéticas descritas no cancro do pulmão, assim como a importância da co-expressão de dois ou mais oncogenes na cronologia do desenvolvimento da neoplasia maligna.

No Quadro VIII indica-se uma proposta para a evolução temporal das diferentes anomalias genéticas encontradas no cancro do pulmão¹⁶.

Como tem sido referido no processo multifaseado da carcinogénese brônquica, as alterações genéticas vão sendo acumuladas de um modo sequencial até que se atinge o fenótipo maligno final. As anomalias que envolvem os receptores dos factores de crescimento são detectadas em estádios precoces da doença, abrindo o caminho para outras alterações. No seguimento, ocorrem deleções nos cromossomas 3p e 9p (no epitélio brônquico ainda com aspectos morfológicos de hiperplasia e de metaplasia), dando-se a perda alélica em 3p antes da de 9p. À medida que o grau de displasia se intensifica, notam-se perdas sequenciais em ambos os cromossomas 3p e 9p, paralelamente à detecção de anomalias que envolvem *ras*, p53 e *bcl-2*, as quais se tornam evidentes na displasia grave e no carcinoma *in situ*. A perda de 5q e as mutações *K-ras* demonstram-se no carcinoma invasivo. Estas modificações genéticas vão-se tornando cumulativas, determinando a transformação maligna da célula e reacções imunológicas do hospedeiro para o seu controlo local.

QUADRO VIII

Evolução temporal das alterações genéticas envolvidas no processo de carcinogénese brônquica

	Normal	Displasia mínima	Displasia moderada	Displasia grave	Carcinoma <i>in situ</i>	Cancro invasivo
EGF-R	+	+	++	++	+++	++++
c-erbB-2	+	+	++	++	+++	++++
3p		+	++	+++	++++	++++
9p			+	++	+++	++++
p53				+	+++	++++
<i>ras</i>				+	+++	++++
bcl-2				++	+++	++++

PROGRESSÃO TUMORAL

A progressão tumoral corresponde à transição de uma população celular homogénea para uma população heterogénea, em que um clone, uma vez estabelecido como imortal, se submete a alterações genéticas e epigenéticas adicionais, que dão origem a uma variedade de fenótipos, os quais definem o comportamento clínico dos tumores³⁸.

Essas subpopulações celulares ficam sujeitas a pressões tendentes a seleccionar as mais aptas que, deste modo, são capazes de invadir localmente os tecidos, metastizar e resistir às terapêuticas citostáticas.

A *evolução genética* do tumor associa-se à instabilidade do clone em transformação, que apresenta uma grande predisposição para modificações da ploidia, dos cromossomas, ou outras³⁸. Essas alterações representam rearranjos genéticos sucessivos e uma doença progressivamente mais avançada e agressiva.

Após as alterações genéticas iniciais, a partir de células normais, as células cancerosas emergentes crescem mais rapidamente que aquelas, por um aumento do número das que estão em fase de divisão, o que se reflecte por um aumento na diversidade do cariótipo intra e intertumoral e pela heterogeneidade clínica destes tumores.

A exposição crónica a agentes de risco, como os asbestos, o radão ou o tabaco, é um factor de grande importância a ter em conta na progressão tumoral, pela agressão contínua do ADN. Outros factores extracelulares, como a acção de fármacos citostáticos administrados na quimioterapia, o estado nutricional do doente, produtos libertados com a morte das células tumorais, ou mediadores da inflamação, também podem actuar neste contexto³⁸.

Indicam-se como exemplos de alterações genéticas associadas à progressão tumoral mutações do oncogene *ras*, que se relacionam com pior prognóstico nos CPNPC, ou a activação do oncogene *Her2/neu* que, naqueles tumores, se acompanha de resistência aos fármacos citostáticos, metástases nos gânglios linfáticos e menor sobrevida dos doentes³⁸.

O gene nm23, identificado nos tumores pulmonares e localizado no cromossoma 17, também tem sido relacionado com um fenótipo agressivo, invasivo e metastático, podendo comportar-se de modo semelhante aos genes supressores tumorais p53 e Rb^{38,101}. Têm sido observadas frequentes mutações nos cromossomas 3p, 13q, e 17p, nos tumores primitivos, quer nos CPNPC em estágio I, como nos CPNPC com metástases cerebrais, mas estas também revelam frequentes perdas de alelos em 2q, 18q, e 22q⁹⁴.

Todos os clones celulares estão sujeitos a um processo de selecção, *positiva* ou *negativa*, tendo

as células malignas vantagens específicas de crescimento no microambiente em que estão inseridas.

Algumas alterações genéticas têm uma acção *negativa* por serem, elas próprias, letais. De facto, alguns clones não sobrevivem pela mutação de genes essenciais; outros clones são inatamente mais antigénicos e estão sujeitos a destruição imune³⁸.

No que se refere à selecção *positiva*, podem apontar-se mutações somáticas que levam à protecção contra factores externos e mecanismos intrínsecos tendentes ao aumento da proliferação tumoral³⁸. Os mecanismos de protecção adquiridos incluem o escape à vigilância imunológica e a resistência aos fármacos³⁵.

Neste aspecto, sabe-se que as células dos tumores primitivos são heterogéneas no que se refere à sensibilidade aos fármacos citostáticos, com diferenças adicionais entre os tumores primitivos e as respectivas metástases³⁸. Os CPNPC apresentam resistência intrínseca aos fármacos citostáticos, enquanto nos CPPC essa resistência costuma ser adquirida, não existindo um mecanismo simplificado que explique como se processa a quimiorresistência no cancro do pulmão^{4,15,23,31}.

No cancro, em geral, a via que se conhece melhor condiciona o aumento de expressão de uma glicoproteína-P (P-gp), codificada pelo gene da multiresistência farmacológica (*MDR1-multi-drug resistance gene*), que se encontra localizado no cromossoma 7, mas também foram identificados mecanismos que envolvem proteínas não relacionadas com aquela^{4,17}. Como complemento aos achados de resistência farmacológica, dependentes do transporte de proteínas a nível da membrana celular, como são os que acabámos de referir, o cancro do pulmão apresenta resistência mediada pela expressão de várias enzimas metabólicas, com é o caso da topoisomerase (topo II), da glutatíon S-transferase (GST), ou da O-6-metil guanina ADN metiltransferase (MGMT)^{17,81}.

Uma melhor compreensão dos diferentes componentes envolvidos na resistência das células tumorais aos agentes citostáticos contribuirá para a

definição de novos alvos terapêuticos no cancro do pulmão, alguns dos quais estão a ser testados clinicamente^{4,97}.

Outros mecanismos de selecção *positiva* incluem a expressão de factores de crescimento e dos respectivos receptores, existindo múltiplos exemplos de estimulação autócrina e parácrina nos CPNPC e nos CPPC^{68,87}.

METASTIZAÇÃO

As células tumorais são heterogéneas e têm propriedades angiogénicas, invasivas e metastáticas diferentes, sendo descritas mutações específicas que se relacionam com o seu potencial metastático³⁸.

O processo de metastização é selectivo para uma subpopulação de células que apresentam uma instabilidade genética marcada e que, estando altamente adaptadas, têm sucesso em invadir e sobreviver na circulação e, eventualmente, em multiplicar-se noutros locais. Também poderão ser capazes de ultrapassar os mecanismos normais de homeostase e as defesas imunológicas do hospedeiro³⁸.

Deste modo, mesmo que grande parte das células libertadas para a circulação pelo tumor sejam potencialmente metastáticas, a maioria é reconhecida e eliminada pelos mecanismos de defesa do organismo, pelo que não apresentam qualquer significado clínico²⁷.

Os condicionantes biológicos que determinam os locais de metastização parecem relacionar-se com a própria biologia das células tumorais e com a daqueles. A terapêutica da doença metastática, para que possa ter êxito, deverá ter em atenção todas estas considerações^{16,67}.

A célula que vai metastizar deverá destacar-se do tumor primitivo, interagir com a matriz extracelular e quebrar a barreira que impede a sua circulação para os vasos sanguíneos ou linfáticos, sendo o acontecimento crítico da invasão tumoral a interacção da célula neoplásica com a membrana basal. Neste ponto, as moléculas de adesão celular poderão

desempenhar um importante papel, tornando-se, por esse motivo, bons alvos terapêuticos, indo os produtos anti-adesão potenciar a acção de determinados agentes citostáticos na eliminação das células neoplásicas em circulação e impedir a sua colonização algures no organismo^{16,38,93}.

A matriz extracelular compõe-se de membrana basal e de outras grandes moléculas, como fibronectina e vitronectina. A degradação do colagénio de tipo IV, um dos componentes da membrana basal, é um dos factos relevantes que contribuem para a invasão das células tumorais e subsequente metastização.

A degradação (proteólise) da matriz extracelular é um acontecimento altamente dinâmico e está dependente do índice de produção dos respectivos componentes, de proteinases e dos inibidores destas⁸⁷. Na sua degradação apontam-se como especialmente relevantes duas famílias de proteinases, o activador plasminogénico (PA) e a metaloproteinase da matriz (MMP). Existe um fino balanço entre o PA e os inibidores-PA, que determina a homeostase normal, e uma vez quebrado esse equilíbrio na doença maligna pode ocorrer a metastização. O mesmo se poderá referir às metaloproteinases, que apresentam inibidores séricos como a α_2 -macroglobulina ou, mais específicos, como os inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMPs), cuja interacção, quando desequilibrada na doença tumoral, contribui para a angiogénese à volta dos ninhos celulares e, deste modo, para o processo de disseminação neoplásica⁸⁷.

De facto, a indução da angiogénese (neovascularização) é um importante mecanismo para que a célula neoplásica possa proliferar e metastizar^{1,62,91}. A proliferação dá-se numa fase pré-vascular, com a invasão local do tumor primitivo, seguida de uma curta fase vascular, com invasão sanguínea e linfática. Os factores angiogénicos determinam crescimento de novos capilares, que apresentam fugas devidas à fragmentação das membranas basais, o que facilita a entrada das células neoplásicas em circulação⁸⁷.

As próprias células tumorais, assim como células

inflamatórias alojadas no local do tumor podem mediar a angiogénese. Neste processo, incluem-se factores como o factor de crescimento fibroblástico (bFGF), o factor de crescimento das células do endotélio vascular (VEGF), interleucinas 1 e 8, angiogenina, angiotropina, factor de crescimento endotelial derivado das plaquetas, factor de crescimento transformador a e b, e factor de necrose tumoral a^{38,87}.

Um ou mais destes factores podem actuar em consonância em resposta ao processo de tumorigénese, sendo a inibição da angiogénese um aliciante alvo potencial de intervenção terapêutica^{7,26,67,87}.

Encontram-se em estudo inibidores das metaloproteinases de matriz, como os produtos marimastat, batimastat, AG3340 (os 3 inibidores de largo espectro mais avançados em termos de investigação clínica), prinomastat, BAY 12-9566 ou BMS 275 1911, anticorpos monoclonais anti-receptores endoteliais do factor de crescimento do endotélio vascular (Rhu MAB VEGF), inibidores da tirosina quinase (SU 5416 ou SU 6668), ou inibidores naturais, como a angiotatina ou a endostatina^{7,16,26,87,91}.

Outros produtos com interesse como inibidores da angiogénese incluem o AGM1470 (derivado fúngico), o CM101 e o tegoclan (derivados bacterianos), o DS4152, a talidomida, o metotrexato, o trimetrexato, a erbstatina, o paclitaxel, a minociclina, a D-penicilamina, o batimastat e o marimastat¹⁶.

Nos carcinomas epidermóides encontrou-se uma correlação inversa entre a expressão de VEGF e a sobrevida global dos doentes, e a sua expressão era maior nos tumores com metástases ganglionares do que naqueles em que estas não existiam⁷³. É controversa a relação entre a expressão de bFGF, que está presente em mais de 70 % dos CPNPC, e o prognóstico destes tumores⁹¹. A expressão do factor de crescimento das células endoteliais derivado das plaquetas (PD-ECGF), que também apresenta propriedades angiogénicas, parece correlacionar-se com a angiogénese tumoral e com um prognóstico negativo nos doentes com CPNPC em estágio N0⁹¹.

O número de microvasos na área tumoral

representa o *índice da angiogénese*, que tem sido estudado no sentido de ser relacionado com o potencial metastático da neoplasia e com o seu prognóstico, o que se tem acompanhado de resultados contraditórios⁹¹.

De facto, o estudo da angiogénese poderá constituir um marcador prognóstico no carcinoma pulmonar em estágio I³⁴. A invasão também se poderá dar em vasos preexistentes e contribuir, deste modo, para a metastização, como foi demonstrado em peças ressecadas cirurgicamente⁸⁷.

Só por si, o seu significado prognóstico é controverso, havendo autores que, nos CPNPC operados, lhe atribuem um significado negativo (densidade microvascular elevada) em relação à sobrevida e às taxas de recidivas pós-operatórias, mesmo na presença de adenopatias negativas, enquanto outros referem pior prognóstico no grupo de tumores T1N0 “não angiogénicos”^{58,91}.

Endereço do Autor:

Serviço de Pneumologia do Hospital de Santa Maria.
Av. Prof. Egas Moniz, 1699 Lisboa, Portugal.
e-mail: rsotto-mayor@netcabo.pt

BIBLIOGRAFIA

1. AIKAWA H, TAKAHASHI H, FUJIMURA S, et al. Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19:4305-4309.
2. ALBANELL F, LEONARDO V, RUSCH M, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1609- 1615.
3. BAILAR JC, GORNIK HL. Cancer undefeated. *New Engl J Med* 1997; 336:1569-1574.
4. BERGH J, LARSSON R, NYGREN P. Resistance to chemotherapeutic drugs in human lung cancer: is circumvention possible? *Lung Cancer* 1993; 9:307-316.
5. BEVERLY PCL, BOBROW LG, SOUHAMI RS (eds). Second International Workshop on Small Cell Lung Cancer Antigens. *Br J Cancer* 1991; 63: Suppl XIV.
6. BOERS JM, VELDE GPMT, THUNNISSEN FBJ. P53 in squamous metaplasia: A marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Crit Care Med* 1996;153:411-416.
7. BONOMI P. Novel approaches for the treatment of non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2001; 28(suppl 14):45-49.
8. BRAMBILLA E, GAZZERI S. P53 Pathway and lung cancer. *In* Brambilla C, Brambilla E (eds). *Lung Tumors. Fundamental biology and clinical management*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1999, pp 173-190.
9. BUNN PA, KELLY K. Antigens in lung cancer : clinical radioimmunolocalization in lung cancer. *Lung Cancer* 1993; 9:171-178.
10. CAGLE PT, EL-NAGGAR AK, XU H-J, et al. Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of lung. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1997; 150:303-400.
11. CAPORASO NE, TUCKER MA, HOOVER RN, et al. Lung cancer and the debrisoquine metabolic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:1264-1272.
12. CARBONE D. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1997; 24:388-401.
13. CARNEY DN, De Leij L. Lung cancer biology. *Semin Oncol* 1988; 15:199-214.
14. CARNEY DN. Lung cancer biology. *Semin Radiat Oncol* 1995; 5(1):4-10.
15. CARNEY DN, MITCHELL JB, KINSELLA TJ. In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morfological variants. *Cancer Res* 1983; 43:2806-2811.
16. CHAN DC, SORIANO A, KANE MA, et al. Biology of Lung Cancer. *In* Hansen HH (ed). *Textbook of Lung Cancer*. Martin Dunitz, London, 2000, pp 27-73.
17. COOKE JT, CRYSTAL RG. Genetic basis of lung cancer. *In* Crystal RG, West JB (eds). *The Lung: Scientific Foundations*. Second Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, pp 2589-2597.
18. COOPER CA, CAREY FA, BUBB VJ, et al. The pattern of K- *ras* mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung. *J Pathol* 1997;181: 401-404.
19. DAVILA DG, WILLIAMS DE. The etiology of lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:505-513.
20. DEVEREUX TR, TAYLOR JA, BARRET JC. Molecular mechanisms of lung cancer. *Chest* 1996;109:14S-19S.

21. DONG X, MAO L. Molecular Biology of Human Lung Cancer: A Detailed Analysis. In Weitberg AB (ed). Current Clinical Oncology: Cancer of the Lung. Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2002, pp 103-127.
22. DOSAKA-AKITA H, HU S-H, FUJINO M, et al. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer. Its synergistic effects with altered *ras* and p53 protein status on prognosis. *Cancer* 1997; 79:1329-1337.
23. DOYLE LA. Mechanisms of drug resistance in human lung cancer cells. *Semin Oncol* 1993; 20:326-337.
24. DUBINETT SM, MILLER PW, SHARMA S, et al. Gene therapy for lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12:569-594.
25. DUGGIRA R, ALMASY L, BLANGERO J. Smoking behavior is under the influence of a major quantitative trait locus on human chromosome 5q. *Genet Epidemiol* 1999; 17(suppl 1):S139-S144.
26. EISEN T. The biology of lung cancer. *Eur Respir Mon* 2001; 17:61-70.
27. FLEISCHHACKER M, BEINERT T, POSSINGER K. Molecular genetic characteristics of lung cancer – useful as “real” tumor markers?. *Lung Cancer* 1999; 25:7-24.
28. FONG F, ZIMMERMAN P, SMITH P. Lung pathology: the molecular genetics of non-small cell lung cancer. *Pathology* 1995; 27: 295-301.
29. FUJIWARA T, GRIMM EA, MUKHOPADHYAY T, et al. Induction of chemosensitivity in human lung cancer *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of the wildtype *o53* gene. *Cancer Res* 1994; 54:2287-2291.
30. GENESTE O, CAMUS AM, CASTEGNARO M, et al. Comparison of pulmonary DNA adduct levels, measured by 32p-postlabelling and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lung parenchyma of smokers and ex-smokers. *Carcinogenesis* 1991; 12:1301-1305.
31. HANSSON J. Mechanisms of tumor cell resistance to cancer chemotherapeutic drugs. *Eur J Surg* 1991; 561:35-44.
32. HARADA M, DOSOKA-AKITA H, MIYAMOTO H, et al. Prognostic significance of the expression of *ras* oncogene product in non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992; 69:72-77.
33. HARBOUR J, LAI S, WHANG-PENG J, et al. Abnormalities in structure and expression of retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988; 241:353-357.
34. HARPOLE D, RICHARDS W, HERNDON J, et al. Angiogenesis and molecular biologic substaging in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:1470-1476.
35. HART IR, SAMI A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992; 339:1453-1457.
36. HECHT SS, HOFFMANN D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 1988; 9:875-884.
37. HIBI K, TAKAHASHI T, YAMAKAWA K, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 1992; 7:445-449.
38. HIRSCHOWITZ EA, CRYSTAL RG. Biology of lung cancer. In Crystal RG, West JB (eds). *The Lung: Scientific Foundation*. Second Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, pp 2579-2588.
39. HIYAMA K, ISHIOKA S, SHIROTANI Y, et al. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and *rb*. *Oncogene* 1995; 10:937-944.
40. HOFFMANN D, HECHT SS. Advances in tobacco carcinogenesis. In Cooper CS, Grover PL (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Springer-Verlag, 1990;94(1):63-107.
41. JACOBSON DR. *Ras* mutations in lung cancer. In Brambilla C, Brambilla E (eds). *Lung Tumors. Fundamental biology and clinical management*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1999, pp 139-156.
42. JOHNSON BE, KELLEY MJ. Biology and molecular genetics of lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med* 1996; 17(4):299-308.
43. JOHNSON P, JOEL S, LOVE S, et al. Tumor markers for prediction of survival and monitoring of remission in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1993; 67:760-766.
44. KAWASAKI M, NAKANISHI Y, KUWANO, et al. Immunohistochemically detected p53 and P-glycoprotein predict the response to chemotherapy in lung cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34(9):1352- 1357.
45. KELLEY MJ, JOHNSON BE. Molecular genetics of lung cancer. In Carney DN (ed). *Lung Cancer*, Arnold, London, 1995, pp 246-266.
46. KERN J, SCHWARTZ D, NORDBERG J, et al. p185^{neu} expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990; 50:5184-5191.
47. KHUDER SA, MUTGI AB. Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest* 2001; 120:1577-1583.
48. KIBBELAAR R, MOOLENAAR C, MICHALIDES R, et al. Expression of the embryonal neural cell adhesion molecule N-CAM in lung carcinoma. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody 735 for the distinction between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1989; 159:23-28.

49. KIRSCH D, KASTAN MB. Tumor-suppressor p53. Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16(9):3158-3168.
50. KOHNO H, HIROSHIMA K, TOYOZAKI T, et al. p53 mutation and allelic loss of chromosome 3p,9p of preneoplastic lesions in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 341-347.
51. KORSMEYER S. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995; 11:101-105.
52. LEDERMAN JÁ, ORNADEL D. The biology of lung cancer. *Eur Respir Mon* 1995; 1(1): 72-90.
53. LEE J, RO J, SAHIN A, et al. Expression of blood group antigen A: a favourable prognostic factor in non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 1991; 324:1084-1090.
54. LEE J, YOON A, KALAPURAKAL S, et al. Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol* 1995; 13:1893-1903.
55. LEE JC, JONG HS, YOO CG, et al. Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer* 1998; 21:99-103.
56. LOWE S, BODIS S, MCCLATCHEY A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266:807-810.
57. LUBIN R, ZALCMAN G, BOUCHET L, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer patients. *Nature Med* 1995; 1:701-702.
58. MACCHIARINI P, FONTANINI G, HARDIN J, et al. Most peripheral, node-negative, non-small-cell lung cancers have low proliferative rates and no intratumoral and peritumoral blood and lymphatic vessel invasion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104:892-899.
59. MANECKJEE R, MINNA JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:3294-3298.
60. MANECKJEE R, MINNA JD. Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 1994; 5:1033-1040.
61. MAO L, LEE JS, KURIE JM, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:857-862.
62. MATTERN J, KOOMAGI R, VOLM M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73:931-934.
63. MCLEMORE TL, Adelberg S, Czerwinski M, et al. Altered regulation of the cytochrome p4501a1 gene: Novel inducer-independent gene expression in pulmonary carcinoma cell lines. *J Natl Cancer* 1989; 81:1787-1794.
64. MEHDI SA, TATUM AA, NEWMAN NB, et al. Prognostic significance of LewisY antigen in resected stage I and II non-small cell lung cancer. *Chest* 1998; 114:1309-1315.
65. MERLO A, GABRIELSON E, ASKIN F, et al. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54:640-642.
66. MIKAYE M, TAKI T, HITOMI S, et al. Correlation of expression of H/ Le^y /Le^b antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1992; 327:14-18.
67. MILLER KD, SWEENEY CJ, SLEDJE JR GW. Redefining the target: Chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):1195-1206.
68. MINNA JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 1993; 103:449S-456S.
69. MITSUDOMI T, OYAMA T, KUSANO T, et al. Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:2018.
70. NAZAR-STEWART V, MOTULSKY AG, EATON DL, et al. The glutathione s-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53:2313-2318.
71. OHATA H, EMI M, FUJIWARA Y, et al. Deletion mapping of the short arm of chromosome 8 in non-small cell lung carcinoma. *Genes Chrom Cancer* 1993; 7:85-88.
72. OHSAKI Y, TOYOSHIMA E, FUJIUCHI S, et al. bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers correlation with survival time. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 915-920.
73. OHTA Y, WATANABE S, MURUKAMI M, et al. Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1041-1045.
74. OTTERSON G, LIN A, KAYE F. Genetic etiology of lung cancer. *Oncology* 1992; 6:97-112.
75. OTTERSON GA, KRATZKE RA, COXON A, et al. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene* 1994; 9:3375-3378.
76. PEZZELA F, TURLEY H, KUZU I, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329:690-694.
77. PRZYGODZKI RM, FINKELELSTEIN SD, LANGER JC, et al. Analysis of p53, K-ras, and C-raf-1 in pulmo-

- nary neuroendocrine tumors. *Am J Pathol* 1996; 148:1531-1541.
78. RABBITS PH. Genetic changes in the development of lung cancer. *Br Med Bull* 1994; 50:688-697.
 79. RENAN MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993; 7:139-146.
 80. RICHARDSON GE, JOHNSON BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20(2):105-127.
 81. RODRIGUES HL. Mecanismos de fármaco resistência no cancro do pulmão. In Sotto-Mayor R, Teixeira E, Maçanita J (eds): *Pneumologia Oncológica. Temas de Atualização*. Permanyer Portugal, Lisboa, 1999, pp 201-226.
 82. ROM WN, HAY JG, LEE TC, et al. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1355-1367.
 83. ROTH JA, GRAMMER SF, SWISHER SG, et al. Gene therapy approaches for the management of non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2001; 28(suppl):50-56.
 84. ROTH JA, NGUYEN D, LAWRENCE DD, et al. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Med* 1996; 2:985-991.
 85. SALGIA R, SKARIN A. Lung cancer: from molecular biology to novel therapeutics. *Hosp Phys* 1996, 32:12-32.
 86. SALGIA R, SKARIN A. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1207-1217.
 87. SALGIA R, SKARIN AT. Molecular and cellular biological abnormalities in lung cancer and the potential for novel therapeutics. In Skarin AT (ed). *Multimodality treatment of lung cancer*. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000, pp 3-25.
 88. SALGIA R, SKARIN A, O'DAY S, et al. CA 125: a useful tumor marker and an indicator of response to therapy in lung cancer. *Proc ASCO* 1994; 13:347a.
 89. SAMET JM. Radon and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:745-757.
 90. SECKL M, HIGGINS T, WIDMER F, et al. [D-Arg1, D-Trp5,7,9, Leu11] substance P: a novel potent inhibitor of signal transduction and growth *in vitro* and *in vivo* in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57:51-54.
 91. SEKIDO Y, FONG KM, MINNA JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378:F21-F59.
 92. SHAPIRO G, ROLLINS B. p16INK4A as a human tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1242:165-169.
 93. SHIBANUMA H, HIRANO T, TSUJI K, et al. Influence of E-cadherin dysfunction upon local invasion and metastasis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1999; 22:85-95.
 94. SHISEKI M, KOHNO T, NISHIKAWA R, et al. Frequent allelic loss on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:5643-5648.
 95. SIDRANSKY D, HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 1996; 47:285-301.
 96. SLEBOS R, KIBBELAAR R, DALESIO O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323:561-565.
 97. SOTTO-MAYOR R. Terapêutica génica do cancro do pulmão. In Sotto-Mayor R, Teixeira E, Maçanita J (eds): *Pneumologia Oncológica, Temas de Atualização*. Lisboa, Permanyer Portugal, 1999, pp 227-236.
 98. SOTTO-MAYOR R. Tumores neuroendócrinos do pulmão. In Sotto-Mayor R, Teixeira E, Maçanita J (eds). *Oncologia Pneumológica/Temas de Atualização*. Lisboa, Permanyer Portugal 1999, pp 301-320.
 99. SOTTO-MAYOR R. Poluição e Cancro do pulmão. In Teles de Araújo A (ed). *Ambiente Urbano e Saúde (IV) – A Cidade, o Clima e os Cidadãos*. Lisboa, 2000, pp 111-131.
 100. SOTTO-MAYOR R. Progressos terapêuticos no cancro do pulmão. Perspectiva actual e futura. In *Monografia do 34º Curso de Pneumologia para Pós-Graduados*. Lisboa, FML/HSM, 2001, pp 23-46.
 101. SOUSSI T. The p53 tumor suppressor gene: From molecular biology to clinical investigation. In Brambilla C, Brambilla E (eds). *Lung Tumors. Fundamental biology and clinical management*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1999, pp 453-471.
 102. SOZZI G. Deletions of the short arm of chromosome 3 and the FHIT gene in lung cancer. In Brambilla C, Brambilla E (eds). *Lung Tumors. Fundamental biology and clinical management*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1999, pp 157-171.
 103. SOZZI G, MIOZZO M, PASTORINO U, et al. Genetic evidence for an independent origin of multiple preneoplastic and neoplastic lung lesions. *Cancer Res* 1995; 55:135-140.
 104. SOZZI G, VERONESE M, NEGRINI M, et al. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996; 85:17-26.
 105. STAHEL RA. Monoclonal antibodies to membrane anti-

- gens of lung cancer. In Carney DN (ed). Lung Cancer. Arnold, London, 1995, pp 191-212.
106. STAHEL RA, et al. Third International Workshop on Lung –Tumour and Differentiation Antigens: Overview of the results and the central data analysis . Int J Cancer 1994; Suppl 8: 6-26.
 107. STANCU M, KING T, MAIZEL A. Molecular Biology of Lung Cancer: A Primer. In Weitberg AB (ed). Current Clinical Oncology: Cancer of the Lung. Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2002, pp81-102.
 108. SUGIO K, KISHIMOTO Y, VIRMANI AK, et al. *K-ras* mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinoma. Cancer Res 1994; 54:5811-5815.
 109. SWISHER SG, ROTH JÁ, NEMUNAITIS J, et al. Adenoviral-mediated p53 gene transfer in advanced non-small cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 763-771.
 110. TONG L, SPITZ MR, FUEGER JJ, et al. Lung carcinoma in former smokers. Cancer 1998; 78:1004-1010.
 111. TRIVERS GE, DE BENEDETTI VMG, CAWLEY HL, et al. Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. Clin Cancer Res 1996; 2:1767-1775.
 112. VINEIS P, CAPORASO N. Tobacco and cancer: Epidemiology and the laboratory. Environ Health Perspect 1995; 103:156-160.
 113. WEIL D, MACK M, ROTH J, et al. Adenoviral-mediated p53 gene transfer to non-small cell lung cancer through endobronchial injection. Chest 2000; 118:966-970.
 114. WEINTRAUB SJ. Inactivation of tumor suppressor proteins in lung cancer. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15:150-155.
 115. WESTRA WH, SLEBOS RJ, OFFERHAUS GJ, et al. *K-ras* oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that *K-ras* mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. Cancer 1993; 72:432-438.
 116. WHANG-PENG J, KAO-SHAN CS, LEE EC, et al. Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer: deletion 3p (14-23). Science 1982; 215:181-182.
 117. WISTUBA II, LAM S, BEHRENS C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. J Natl Cancer Inst 1997; 89:1366-1373.
 118. YASHIMA K, LITZKY L, KAISER T, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. Cancer Res 1997; 57:2373-2377.
 119. YOKOTA J, AKIYAMA T, FUNG Y, et al. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small cell lung cancer. Oncogene 1988; 3:471-475.
 120. ZALCMAN G, SCHLCHTHOLZ B, TREDANIEL J, et al. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy :relationship to response to treatment. Clin Canc Res 1998; 4:1359-1366.
 121. ZHANG W, ALEMANY R, WANG J, et al. Safety evaluation of adCMV-p53 *in vitro* and *in vivo*. Hum Gene 1995; 6:155-164.