

ATUALIDADES EM TERAPIA ONCOGÊNICA ANTIANGIOGÊNICA

*Israel Pinheiro Campos * João Fernando Pavão de Faria Romão **

*Marcelo Silva Watanabe * Fernanda Baptista de Melo **

*Cibele Aparecida Fabichak ***

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e a busca da cura desse mal é uma das principais preocupações da medicina moderna. Neste sentido, na última década dois nomes têm se destacado no estudo do crescimento tumoral e a busca da cura: Judah Folkman e Michael O'Reilly.

Seus estudos sobre a angiogênese tumoral permitiram a identificação de dois agentes, angiostatina e endostatina, que mostram grande potencial na terapêutica antineoplásica, agindo justamente na inibição dessa angiogênese.

O marco desse estudo foi a observação clínica e laboratorial do rápido crescimento e disseminação de inúmeros focos tumorais após a retirada de um tumor primário. Concluiu-se, portanto, que a presença deste inibia de alguma forma o crescimento dos demais focos.

Essas duas novas substâncias vêm se somar às várias terapias antiangiogênicas tumorais em estudo, como o trombospondin, interferon, inibidores das metaloproteinases; porém, com a vantagem de serem até o presente momento, sem efeitos colaterais.

Este trabalho relata os fatos e achados clínicos e

laboratoriais que levaram a descoberta da angiostatina e da endostatina, baseados nos recentes estudos de vários pesquisadores que buscam a cada dia respostas para a cura do câncer.

Descritores: Neoangiogênese – Angiostatina – Endostatina – Terapia antitumoral

INTRODUÇÃO

O câncer é atualmente um problema de saúde pública em todo o mundo. Só nos Estados Unidos são mais de 500.000 mortes anuais causadas pelo câncer, muitas delas ocorrem após o desenvolvimento da resistência à quimioterapia. (2)

Cerca de 30% dos pacientes submetidos à quimioterapia, desenvolvem resistência. (8)

O início da resistência, é em parte devido à instabilidade genética, heterogenicidade, aumento da mutação de células tumorais.(2) Eventos como deleção parcial ou completa de cromossomos, amplificação de genes translocação, rearranjos cromossômicos de simples mutação asseguram efi-

* Acadêmicos do 4º ano da Faculdade de Medicina do ABC

** Profª Assistente da Disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina do ABC

Trabalho realizado na Disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina do ABC

Israel Pinheiro Campos: Rua Guilherme Marconi, 237 Vila Assunção

Santo André – São Paulo CEP: 09020 - 270

ciente seleção e grande crescimento de células tumorais, resistentes a drogas.(8)

Entretanto, um tumor não é composto apenas por células neoplásicas. Toda neoplasia necessita de vasos sanguíneos que permitam fluxo adequado de nutrientes para seu crescimento.

As células endoteliais destes vasos formados pelos tumores, apresentam baixa taxa de mutações e grande estabilidade genética, logo, menor propensão ao desenvolvimento de mecanismos que induzam resistência à quimioterapia.(8)

Além disso, outros fatos observados na clínica com pacientes em que a remoção de certos tumores eram seguidas por rápido crescimento de metástases ou em pacientes terminais onde se observa que um tumor primário inibia o crescimento de tumores secundários de mesmo tipo histológico ou não (12). Estes achados resultaram em pesquisa de como um tumor inibia o crescimento de outro, mas não o seu próprio crescimento.

À luz de ambos conhecimentos, os cientistas Judah Folkman e Michael O' Reilly baseados no estudo da angiogênese tumoral e no conhecimento do mecanismo do crescimento de um tumor dependentes de fatores inibitórios e estimulantes produzidos pelo próximo tumor, anunciaram nos últimos anos o sucesso de uma nova terapia contra o câncer direcionada ao combate da angiogênese por duas novas drogas: Angiostatina e Endostatina.

CARCINOGENESE

O evento da carcinogênese é complexo e multiinstitucional. Durante a carcinogênese ocorre maior proliferação celular, com sua diminuta eliminação através do sistema imunológico, ocasionando o aumento de tecido tumoral.

1. Fatores oncogênicos:

São fatores que agem na tumorigênese de forma complexa e com ação múltipla.

Basicamente, agem como um fator indutor inibindo a repressão do DNA, estimulando portanto, a formação de RNA e proteínas na fase G_1 e a síntese aumentada da DNA na fase S do ciclo celular, determinando um tempo de geração mais prolongado. Isto significa que, em tecidos normais ocorre uma elevada proliferação celular do compartimento progenitor (G_1), onde o tempo de geração (duração do ciclo celular) está encurtado determinando um maior número de células; já no tumor, o ciclo é mais prolongado que o normal, ou seja, células tumorais não proliferam mais rápido que células normais e sim possuem um índice mitótico diário maior, aumentando a fração de células que participam do *pool* proliferativo (aumenta o número de células na fase G_0 que passam para G_1). (5)

O crescimento tumoral irá, dessa forma, ser dependente do tipo de tumor (histologia e metabolismo) e de vários fatores oncogênicos.

1.1. Inibição por contato:

Geralmente o crescimento celular se dá em uma monocamada, com distribuição e morfologia homogênea, às custas de GF_s (fatores de crescimento). Quando esse crescimento celular provoca o contato entre as células através de suas membranas celulares ocorre uma inibição do crescimento, com a sua conseqüente parada: é a chamada inibição por contato.

Já nas células neoplásicas esse crescimento celular é diferenciado: elas não são tão dependentes das GF_s para crescer; possuem heterogenicidade morfológica e não possuem inibição por contato, crescendo e não respeitando os limites da célula vizinha. Essa última característica é fundamental para o processo carcinogênico, visto que, a célula tumoral é capaz de crescer em suspensão (sem uma superfície como substrato) anarquicamente.

1.2. Oncogenes:

São genes que de alguma forma possuem um potencial de transformação de células normais em células neoplásicas, estando relacionados com a indução e evolução do tumor. Podem ser de caráter genético especificamente, ser resultante da ação dos agentes oncogênicos ou ser produto de ambos (oncogenes que podem ser ativados pela presença de fatores oncogênicos). Nesse sentido vale destacar a importância dos protooncogenes, os quais são genes que normalmente controlam o metabolismo celular e, quando alterados, são ditos oncogenes, agora com capacidade de ativar fatores de transcrição que estimulam a síntese protéica em uma célula transformada que adquire a capacidade de desencadear o processo de divisão sem estímulos externos (sem feedback). (5)

Alguns oncogenes estão relacionados com o comportamento tumoral, determinando uma maior ou menor agressividade, como é o caso do *myc n*. Outros determinam maior resistência à múltiplas drogas, como o *mdr 1*. Já 95% das mutações ocorre no *p53* que, quando alterado, não leva à morte celular.

Portanto, o desenvolvimento de câncer deve seguir eventos genéticos pré- estabelecidos para que possa ser concretizado:

- Deve haver a ativação dos protooncogenes. Essa ocorre por translocação, mutação ou amplificação.
- Pode ocorrer perda dos genes supressores, os quais controlam genes com atuação "anômala" na célula.
- Instabilidade genética nos genes de reparo do DNA.
- Perda dos genes da apoptose.

1.3. Vírus oncogênicos:

Um vírus, especialmente os retrovírus, pode carregar um oncogene ou se incorporar em uma célula e alterar seus próprios protooncogenes, levando à formação de oncogenes. Essa alteração no DNA consegue se perpetuar para as próximas gerações celulares. (5)

1.4. Fatores físicos e químicos:

Fatores físicos como as radiações ionizantes e químicos como substâncias cancerígenas possuem a capacidade de provocar alterações pontuais no material genético celular, criando produtos genéticos que codificarão proteínas anômalas com potencial de estimular o crescimento celular, mas não o de pará-lo.

Esses efeitos são exercidos através de translocações cromossômicas, mutações, ampliações e deleções. (5)

1.5. Fatores mecânicos:

Fatores mecânicos traumatizantes e repetitivos em um mesmo local podem predispor ao aparecimento de uma lesão pré-cancerosa. Isso ocorre em virtude do processo de reparação celular em que há aumento da proliferação celular (hiperplasia), bem como o aumento do tamanho dessas células (hipertrofia), facilitando a formação de uma célula anaplásica durante o processo de divisão mitótica. (5)

CRESCIMENTO TUMORAL E NEOANGIOGÊNESE

Angiogênese é o processo pelo qual uma estrutura estimula a formação de novos vasos sanguíneos. É um processo firmemente controlado, normalmente dependente de inúmeros fatores estimuladores e inibidores.

Angiogênese é diferente de vasculogênese, pois esta última se apresenta no embrião. A angiogênese possui 4 estágios: 1. Aumento da permeabilidade capilar. 2. Produção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular e promovem migração de células endoteliais. 3. Diferenciação em novos vasos. 4. Estabilização e maturação de vasos por moléculas mediadoras que recrutam células mesenquimais (4).

Duas vias distintas induzem a angiogênese: uma engatilhada pelo fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e TNF α e requer interação com XVb3. O TNF α é um ativador angiogênico "in vivo", mas não "in vitro". Ela induz a produção de secreção de proteína B61, que funciona como quimioatrativo e fator angiogênico, pois é o gatilho na síntese de fator ativador de plaquetas (PAF): fosfolipídeo que estimula a quimiocinese e provoca resposta angiogênica. O

TNF α também estimula a síntese de óxido nítrico, que é angiogênico. A segunda via é a do VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular do tipo A), que também ativa monócitos e é XVb5 dependente. O VEGF-A é uma glicoproteína dimérica relativamente específica e seu mais poderoso indutor é a hipóxia, formando novos vasos providenciando aumento da oxigenação. Células tumorais expressando o k-ras ou h-ras mutantes mostram um estímulo da transcrição de VEGF-A, sugerindo uma ligação potencial entre tumorigênese e angiogênese. (4)

Nas neoplasias, a mutação do P53 induz à angiogênese que é um componente da progressão do tumor. (4)

O crescimento e evolução tumoral está na dependência direta de sua capacidade de estimular sua neoangiogênese. Isso não só pelo fato que esta é necessária para um aporte nutricional adequado mas também porque o crescimento e desenvolvimento tumoral está em certo grau na dependência de certos fatores de crescimento produzidos por seu endotélio. (15)

Um tumor ficará isolado localmente (*in situ*) até que atinja um tamanho mínimo, que lhe permita estimular sua neoangiogênese de modo eficiente. (12)

Por outro lado, grandes tumores, com depleção de seu leito vascular ou da capacidade de estimular o crescimento deste, regridem rapidamente. (12)

A entrada de células tumorais na circulação é ressaltada pela angiogênese, pois os vasos sanguíneos imaturos são mais permeáveis. (17)

Também é observado que todos inibidores angiogênicos (esteróides angiogênicos, talidomida, Fumagelin análogo TNP-470, trombospondin, angiostatina e endostatina entre outros) inibem metástases tumorais. (17)

Wendner mostrou uma correlação direta entre a densidade vascular e a probabilidade de metástase em pacientes humanos, com câncer de mama. (17)

O crescimento de metástases, não ocorrerá por sua vez, enquanto estas em seu foco forem bombardeadas por fatores antiangiogênicos. Michael O' Reilly demonstrou como esse bombardeamento era produzido a partir de um tumor primário. (12)

O tumor primário produz duas qualidades de fatores que atuam sobre a angiogênese: um que a estimula e outro que inibe. O tumor primário produz os dois, porém o fator estimulatório é produzido em quantidade maior em relação ao inibitório. Logo, o efeito estimulador prevalece sobre o inibidor localmente. O fator estimulador tem meia-vida muito curta e o inibidor longa, assim, ao atingirem a circulação sanguínea; nos focos

tumorais periféricos o fator inibidor derivado do tumor primário se encontra em maior concentração que os fatores estimuladores produzidos nestes focos, o que permite a inibição do tumor primário sobre os focos periféricos. Para este último fenômeno ocorrer, o tumor primário deve ter um tamanho mínimo para que sua produção de fatores inibidores seja suficiente para causar seu efeito nos focos periféricos. A qualidade do tumor também é importante para tal. Deste modo, o foco neoplásico primário consegue estimular o crescimento de seu leito vascular ao mesmo tempo que inibe o crescimento de focos periféricos. (12,14)

Portanto, uma vez realizada a ressecção total ou parcial de certos tipos de tumores, corre-se o risco de rápido crescimento e desenvolvimento metastático ou segundo primário (focos neoplásicos periféricos que não se manifestaram anteriormente porque seu crescimento era inibido pela presença daquele que foi retirado).

TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS NATURAIS NÃO-TUMOR DERIVADO

1. Trombospondin:

A suspeita inicial da relação entre o *trombospondin* e sua propriedade antiangiogênica foi feita por Bouck et al, que relacionaram essa atividade com a expressão de um gene supressor do tumor. *Trombospondin* é um inibidor da proliferação celular do endotélio, motilidade e morfogênese.

Foi noticiado que a supressão do tumor, bem caracterizado, *p53* pode reprimir a angiogênese pela estimulação da produção de *trombospondin* ou outros inibidores em certas células do tumor. Em um estudo mais recente foi demonstrado que a expressão de *trombospondin* é inversamente relacionada com a angiogênese e expressão do *p53*. (17)

2. Interferon:

Foi demonstrado o efeito do interferon de inibir a migração de células endoteliais de capilares, passo importantíssimo no processo angiogênico. Sua ação antiangiogênica ocorre “in vivo”, mas ele não é suficientemente potente para causar regressão tumoral quando usado sozinho.

O interferon age bloqueando a produção ou a eficácia de fatores angiogênicos produzidos por células tumorais. A sensibilidade ao interferon varia de tumor para tumor, por exemplo, os hemangiomas, que são tumores benignos constituídos basicamente por células endoteliais, são extremamente sensíveis ao tratamento com interferon, tanto que o tratamento com a-interferon é um dos tratamentos bem sucedidos e protocolados no combate de hemangiomas. O uso

de a-interferon é de longa duração, durando, muitas vezes, 1 ano ou mais, mas possui a vantagem de ser relativamente atóxico. (17)

3. Inibidores da metaloproteinase:

A metaloproteinase é responsável por permitir destruição limitada de tecido conectivo em bom estado para possibilitar a migração tecidual de células tumorais.

Vários inibidores naturais das metaloproteinases têm sido encontrados em uma variedade muito grande de células e tecidos. Todas as substâncias da família dos inibidores da metaloproteinase são agentes antiangiogênicos. Esses inibidores são responsáveis por inibir o crescimento do tumor e formação de metástase. O mecanismo para isso ocorrer se deve ao fato dos inibidores suprimirem a degradação de matriz extracelular. Parece também que eles podem bloquear diretamente a proliferação e migração de células tumorais e endoteliais “in vitro”. (17)

TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS ARTIFICIAIS

1. Inibidores sintéticos de protease:

Entusiasmados com os efeitos anti-tumorais dos inibidores da metaloproteinase, vários pesquisadores vem desenvolvendo inibidores sintéticos de proteases, os quais podem ser agentes terapêuticos proveitosos. Um exemplo dessa classe de drogas é o BB94, ou *batismatat*, que mostra um grande e crescente potencial antitumoral, antiangiogênico, antimetastático em tumores experimentais com relativa baixa toxicidade em tratamentos clínicos preliminares. (17)

2. Peptídeos anti-adesivos:

Para ocorrer o processo angiogênico faz-se fundamental a capacidade de migração de células endoteliais, proliferação e morfogênese.

Recentes trabalhos de Cheresch e colaboradores vem destacando as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ como mediadores importantes da angiogênese. Isto vem sendo também verificado pelo fato de que a angiogênese e o crescimento tumoral podem ser inibidos por anticorpos anti-integrinas, bem como por antagonistas que bloqueiam a interação dessas integrinas com suas matrizes extracelulares ligantes. Observou-se a ocorrência de apoptose celular, em endoteliócitos de vasos novos, quando em contato com esses inibidores, porém, células em veias maduras preexistentes não são afetadas.

Pasqualine e colaboradores em recente publicação mostraram que o RGD ciclado, contendo peptídeos que inibem a função das integrinas, possui sua ação em bacteriófagos. Quando o fago foi ino-

culado em animais experimentais, ele localizou preferencialmente em neovasos sanguíneos tumorais, provavelmente por uma interação com as integrinas endoteliais, as quais têm sido estimuladas durante a angiogênese.

Esta tecnologia permite atingir os diversos agentes angiogênicos nos locais de neovascularização tumoral, criando um enorme potencial de novos métodos que bloqueiam a proliferação celular e a expansão de tumores primários e secundários, além de possuírem uma relativa baixa toxicidade. (17)

AGENTES FARMACOLÓGICOS QUE INIBEM ANGIOGÊNESE

1. AGM-1470 / TNP-470:

A observação inicial feita por Irgber descreve que o antibiótico fúngico *fumagilin* é um potente inibidor da angiogênese. Isto possibilitou o desenvolvimento de análogos sintéticos do *fumagilin* com atividade antiangiogênica. Entre estes novos compostos está o O-cloroacetilcarbamoilfumagilol, primeiramente referido como AGM-1470 e mais recentemente como TNP-470, possuindo capacidade de inibição da proliferação de células endoteliais “in vitro” e angiogênese “in vivo”.

O TNP-470 tem sido estudado em processos humanos mais do que qualquer outra droga antiangiogênica desenvolvida. Ela vem sendo usada em tratamentos oncológicos de tumores primários e resultados preliminares sugerem que o tratamento à longo prazo (maiores que 1 ano), com o TNP-470 são muito bons, porém a droga não pode ser interrompida precocemente se o tumor demonstrar sinais de regressão, porque os efeitos dos agentes tomam mais tempo para serem traduzidos dentro da estática tumoral ou regressão. (17)

2. Talidomida:

Recentemente D'Amato e colaboradores noticiaram a potente atividade antiangiogênica da droga *talidomida*. Inicialmente foi usada como um sedativo mas seu uso foi descontinuado, tendo em vista ser um potente agente teratogênico, afetando mulheres grávidas e resultando em sérios defeitos congênitos no concepto, especialmente no desenvolvimento dos membros, quadro conhecido como focomelia. Porém essa atividade teratogênica possibilitou um potente mecanismo contra a atividade angiogênica, pois o desenvolvimento de um membro é sensível ao crescimento da densidade vascular do mesmo.

O uso da *talidomida* é totalmente atóxico. Está em teste, recentemente, o uso de *talidomida* por indivíduos adultos sem gravidez (fase 2) em processos clínicos que evoluam para grande proliferação de vasos como os tumores, a retinopatia di-

abética proliferativa, cegueira da prematuridade e degeneração macular. (17)

3. CAI:

O carboxiamidotriazol (CAI) é um inibidor do canal de cálcio, bloqueando indiretamente a migração e proliferação de células tumorais, bem como da atividade angiogênica.

O CAI retarda a metástase em experimentos animais, e completou a fase 1 de processos clínicos em pacientes com câncer. Houve estabilização da doença em 49% dos pacientes que tiveram a progressão da doença antes de começar o tratamento.

Futuras avaliações deste curioso agente multimodal antitumor estão a caminho. (17)

AGENTES TUMOR- DERIVADOS

Tendo em vista trabalhos que comprovam que o tumor primário conseguia inibir adequadamente outros tumores, sendo estes de mesma linhagem histológica ou não, torna-se necessário isolar o fator responsável por tal fato. (6)

Através da utilização de um modelo animal cujo sistema imune foi depletado, foram implantadas pílulas bFGF na córnea de ratos. Um grupo era composto por animais portadores de nove categorias diferentes de carcinomas humanos, e outro grupo (controle) compreendia ratos sem tumor. O estudo teve objetivo de detectar a circulação de inibidores da angiogênese tumor derivados. (6)

Para tal, foram analisados o comprimento, diâmetro e densidade de vasos neoformados.

Observou-se que tumores diferentes tinham padrão de inibição diferente dos diversos parâmetros. Desde inibição máxima dos 3 parâmetros pelo carcinoma pulmonar de Lewis até mínima inibição como no carcinoma de colo (conhecido como CX 1). (6)

Tais dados sugerem que tumores diferentes têm padrão de inibição angiogênica diferente, o que se reflete na clínica como comportamento mais ou menos agressivo.

Aqueles que “in vitro” apresentaram maior potência inibitória angiogênica são os mesmos com menor taxa de metástases (6)

Em outro experimento usando ratos com sistema imune depletado portadores de carcinoma pulmonar de Lewis, observou-se que a remoção deste era rapidamente seguida de crescimento de focos metastáticos. (6,12)

Também constatou-se que ratos com o tumor removido nos quais foram injetados intra peritonealmente soro e urina de ratos que mantinham seus tumores intactos, não houve crescimen-

to metastático, o que não se obteve com soro e urina de ratos sem tumores. (6,12)

Através da purificação do soro e urina destes ratos foram isoladas duas substâncias que pareciam ser responsáveis por tais efeitos antitumorais derivados de tumores, chamados Angiostatina e Endostatina.

ANGIOSTATINA

Foi observado na clínica que após a remoção de certos tumores primários ocorria um grande incremento de metástases. Também se observou que a involução de um tumor primário geralmente era contemporâneo ao desenvolvimento de um foco metastático (12). Estudos em ratos onde foram implantados carcinomas humanos comprovam tais fatos. Demonstrou-se que a administração de soro e urina dos ratos com tumor naqueles cujo tumor primário foi ressecado, o desenvolvimento metastático não ocorria e que tais líquidos orgânicos também inibiam o crescimento de colônia de células tumorais "in vitro". Porém, não apresentavam efeito inibitório a urina e o soro de ratos controles, os quais não tinha sido implantado tumor algum e, portanto, não haveria substância inibidora. Mostrou-se que a administração seqüencial bloqueia fortemente a neovascularização e o crescimento metastático e do tumor primário quando em dose suficiente (12).

Com métodos de isolamento e detecção do fator inibitório, foi descoberto que tratava-se de um proteína de Peso Molecular igual a 38KDa identificada como sendo homóloga em 98% a um fragmento interno de plasminogênio, com N-terminal de 98 aminoácidos e C-terminal de aproximadamente 440 aminoácidos. Possui as três primeiras "regiões kringle" descritas como sítio lisiniligante I e que tem atividade inibitória na proliferação celular endotelial capilar. A esse fragmento deu-se o nome de angiostatina. Nota-se que o plasminogênio intacto não tem essa atividade. Sua atividade inibitória é detectada na circulação acima de 5 dias (atividade máxima inibitória 50% é de 2,5 dias) depois de removido o tumor primário. (12)

Descobriu-se que ambas (angiostatina e endostatina) exercem seu efeito quando se ligam a uma enzima dita adenosina trifosfato sintetase (ATP sintetase) presente na superfície das células endoteliais dos capilares tumorais. Esta enzima permite um fluxo de energia extra às células que crescem em ambiente com baixa concentração de oxigênio devido à compressão tumoral. A angiostatina se liga bloqueando este fluxo extra de energia para o crescimento vascular. A pesquisadora Tammy Moser separou 2 subunidades a e b. Quando se usa um anticorpo contra a unidade

a, este diminuía a ligação da angiostatina em até 50% com diminuição de seu efeito em 80%, mostrando que seu efeito é mínimo quando não ligada à ATP sintetase. A identificação deste mecanismo parece ser o passo fundamental para a fabricação de moléculas que mimetizam a ação da angiostatina e da endostatina. (1)

Angiostatina é gerada por proteólise de plasminogênio câncer-mediada. Este é o mecanismo direto de formação. Em experimentos com carcinoma de células prostáticas humanas (conhecido como PC-3), estas determinam atividade enzimática que converte plasminogênio com liberação de 2 componentes: uroquinase (uPA) e doadores sulfidril livres (FSD). Em um sistema independente de células, ativadores de plasminogênio (uPA, ativador de plasminogênio tipo tissular (tPA), ou estreptoquinase) em combinação com um de uma série de FSD (N-acetil-L-cisteína, D-penicilamina, captopril, L-cisteína ou glutathione reduzido) geram angiostatina "in vitro" e em "in vivo". Plasminogênio é primeiro convertido em duas cadeias plasmina proteinase serina, por uPA, e na presença de um FSD, a plasmina serve como substrato e enzima para geração de angiostatina. A disponibilidade local ou sistêmica de FSD pode ser um importante ponto regulador da cascata angiogênica. A perda potencial de atividade catalítica de plasmina que pode ser resultante da conversão de plasmina para angiostatina contribuiria para reduzir a fibrinólise e o estado de hipercoagulação frequentemente observado em pacientes com câncer. Como é um sistema independente de células, permite uma produção eficiente em larga escala de angiostatina. (7)

Foi demonstrado que dois membros da família das metaloproteinases (MMP), matrilysin e gelatinase tipo B colagenase IV (MMP 9) hidrolisam o plasminogênio em angiostatina. Este é o mecanismo indireto de formação. A banda de 58KDa deriva da clivagem do plasminogênio pela MMP 7 e MMP 9, ambos com o N-terminal correspondente a angiostatina. No carcinoma pulmonar de Lewis a enzima responsável pela conversão é a MMP 12, derivada de macrófagos. Estudos mostram que a angiostatina seria o primeiro de quatro fragmentos derivados do plasminogênio. (13)

Estudos demonstram que a protease que cliva o plasminogênio em angiostatina é conhecida também por sua ação de remodelação da matriz extra celular, sendo que o mecanismo de ação da angiostatina pode envolver modificações desta.

Foi administrada em ratos com hemangioteilioma associado à Coagulação Intravascular Disseminada (Síndrome de Kasalback Merrit) angiostatina, que diminuiu o volume tumoral, aumentando a sobrevida, prevenindo trombocitopenia e anemia presentes nesta

síndrome. Observou-se aumento na taxa apoptótica sem alterações da taxa proliferativa tumoral. Essa síndrome ocorre geralmente em crianças, caracterizada por rápido aumento de células endoteliais primárias derivadas de tumor com carência de Coagulação Intravascular Disseminada. A inibição do hemangioglioma foi observada "in vivo", mas não "in vitro, de células derivadas do tumor; em contraste, inibiu totalmente a proliferação de células endoteliais não transformadas induzidas por bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico). Tal tratamento também não inibiu o aparecimento de novos tumores pós-inoculação, mas em cerca de 6 dias após, o volume destes nos ratos tratados era muito menor que nos controles. Tal dado sugere que os efeitos da angiostatina são decorrentes da inibição do fenômeno neoangiogênico como um todo, do que um simples efeito sobre as células endoteliais derivadas do tumor. O tratamento com angiostatina em crianças com Síndrome de Kasalback Merrit parece cada vez mais indicado na medida em que além de atuar sobre o tumor e as complicações hematológicas, não apresenta os seríssimos efeitos colaterais dos demais tratamentos adotados. (9)

Foram testados 4 tipos distintos de tumores quanto à resistência pela radioterapia. A combinação de radioterapia com angiostatina não mostra incremento à citotoxicidade. "In vitro" demonstra-se um incremento da ação sobre as células endoteliais, mas não sobre as tumorais. A dose de angiostatina foi de 25mg/Kg/dia (dos ótima para a combinação). Em ratos com o tumor conhecido como SQ 20B, a combinação mostrou redução de 64% do volume tumoral comparado com angiostatina (16%) e radioterapia (18%). Os efeitos citotóxicos foram testados em células humanas endoteliais da aorta e células endoteliais da veia do cordão umbilical humano. Não houve diferença de apoptose entre ambas com o tratamento convencional e combinado. (10)

ENDOSTATINA

A endostatina é o fragmento terminal, (MR 20,00 COOH - terminal), do colágeno XVIII. Foi identificada utilizando-se uma técnica similar a da angiostatina.

A endostatina inibe a proliferação endotelial, sendo potente inibidor da angiogênese e do crescimento do tumor. Trabalhos mostram que tumores primários podem regredir a pequenas lesões dormentes. Com o auxílio da imunohistoquímica observou-se bloqueio da angiogênese acompanhado por apoptose em células tumorais. (16).

Muitas pesquisas evidenciam que a angiogênese é essencial para o crescimento e persistência do tu-

mor sólido e suas metástases. Para a simulação da angiogênese, o tumor estimula a produção de uma variedade de fatores de angiogênese, (incluindo fatores de crescimento de fibroblasto, de célula endotelial e até fator de permeabilidade vascular). Torna-se claro que o fenótipo da angiogênese é o balanço de estimulação e inibição dos reguladores da neovascularização. A terapia sistêmica com endostatina causa quase completa supressão da angiogênese induzida pelo tumor, o que resulta em uma grande atividade anti-tumoral

Histologicamente o tumor regride na terapia com endostatina, mostrando que o bloqueio da microcirculação derivada da angiogênese vem destruindo células perivasculares e marginais ao tumor. (11)

Doses farmacológicas de endostatina, um C-terminal fragmento de colágeno XVIII com massa molecular relativa 20.000, em muito baixas concentrações podem ser depositadas em matrizes extracelulares com cada ciclo de terapia, analogamente a depósitos amilóides em pacientes de cadeia leve. A acentuada redução, de aproximadamente, 250-450 mm³ para 5 - 50 mm³, de tumores de rato, pode efetivamente aumentar a concentração de endostatina na matriz extracelular. Cada sucessivo ciclo de reamento seguido de tratamento e regressão podem progressivamente aumentar a concentração de endostatina no local da matriz extracelular até que a concentração seja suficiente para inibir futuras angiogêneses.

Este fenômeno de concentração preferencial pode explicar a observação de um tumor primário inativo, enquanto o mesmo tipo de tumor inoculado à distância poderia não ser inibido. A concentração de endostatina na matriz extracelular nestas posições distantes poderia ser um dos grandes fatores que reduzem a concentração da posição primária do tumor e angiogênese dirigida a tumores.

Caso esta hipótese estiver correta, ela poderia significar o caminho ideal para a administração da terapia com endostatina, entregando uma alta concentração inibidora de endostatina à posição primária do tumor enquanto guarda o sistema de concentração da matriz extra celular, baixando o nível necessário para inibir naturalmente a ocorrência de angiogênese tal como ferida cicatrizada. (3)

CONCLUSÃO

O conceito antiangiogênico parece unificar atualmente as perspectivas futuras na luta contra o câncer.

Seus efeitos estão sendo agora estudados sobre tumores líquidos ou sanguíneos. Foi observado por Folkman a presença de micro vasos, como arbustos, cheios de células tumorais na medula óssea

de crianças com leucemia, o que sugere que as novas células tumorais se desenvolvem nestes sítios neovascularização antes de serem liberadas para corrente sanguíneas. (15)

Além dos efeitos benéficos próprios da angiostatina e endostatina e seu uso isolado, temos suas contribuições na associação com radio e quimioterapia, potencializando os efeitos destas e reduzindo seus danos, pois requerem doses menores. São drogas de amplo espectro de ação contra diversos tipos de neoplasias e que até o momento não demonstraram efeitos colaterais, nem resistência. Além de seu efeito antiangiogênico tumoral, podem ser testadas em outras patologias, como por exemplo a retinopatia diabética.

Apesar de toda esperança que surge à luz destas descobertas, deve-se dar um passo para trás

e olhar os fatos que levaram a elas com maior cuidado. Entender o câncer não apenas como uma simples doença degenerativa mas como algo que luta por seu ambiente contra outros “iguais a si”.

Seu comportamento que a muito é dito caótico e desgovernado, visto por este novo prisma parece até consciente e racional, como o instinto do animal, pois preserva o meio em que vive para si e assim assegura sua sobrevivência.

De tudo isso fica a certeza de que ainda há muito a se descobrir sobre a fisiopatologia do câncer e ainda perdura a questão: qual a sua real finalidade?

Assim, como todo problema encerra sua própria solução, a cura do câncer só será obtida, quando se entender a verdadeira natureza das neoplasias



Figura 1: Inibição do crescimento de metástases pela presença de um tumor primário.

Trinta ratos foram implantados com Carcinoma Pulmonar de Lewis. Quando os tumores estavam com 1500 mm³, metade dos ratos teve seu tumor removido. Com 15 dias do tumor removido, o número de metástases na superfície pulmonar e o peso do pulmão tinham marcadamente aumentado quando comparado com os ratos de tumor primário intacto. Nestes, o peso pulmonar não foi significativamente diferente daquele com um pulmão normal (200 mg). (12)

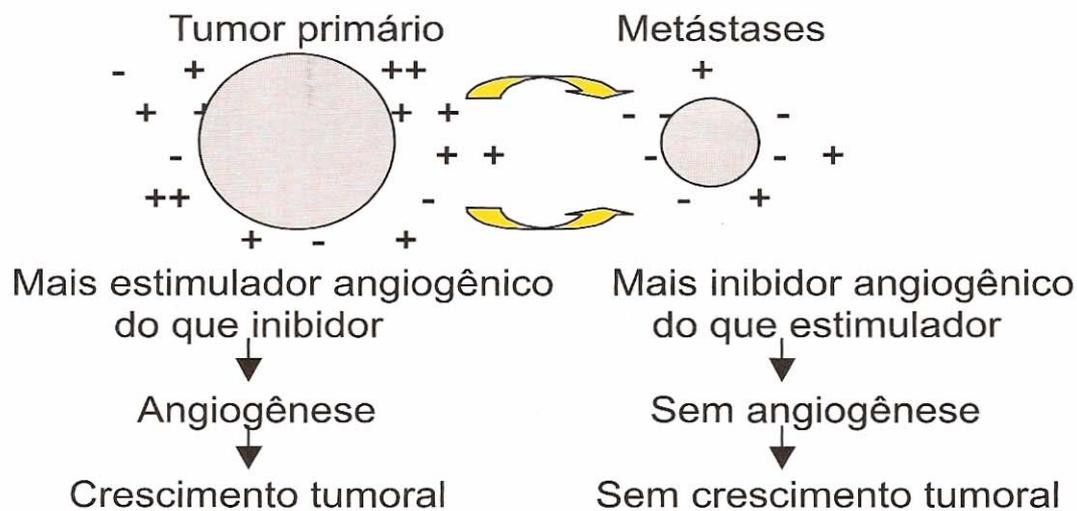


Figura 2: Inibição do crescimento de metástases por tumores primários.

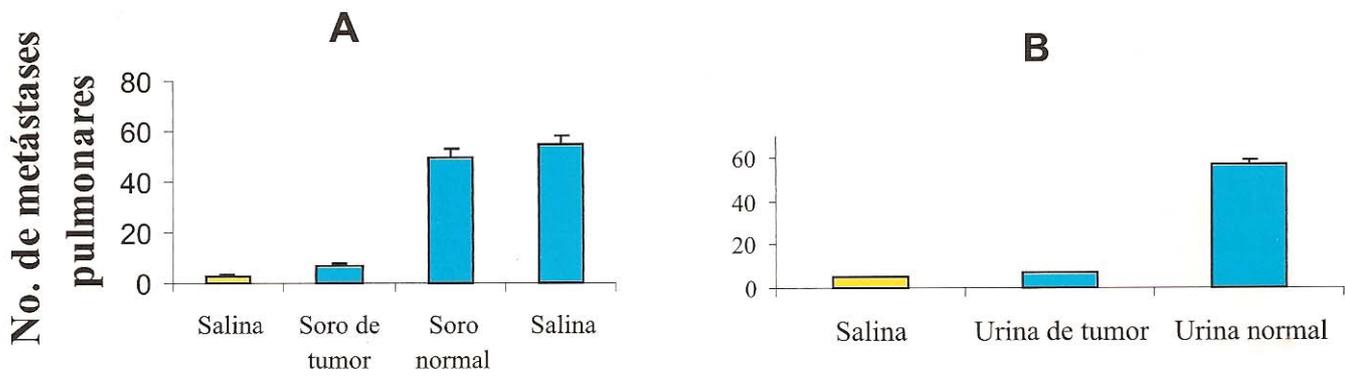
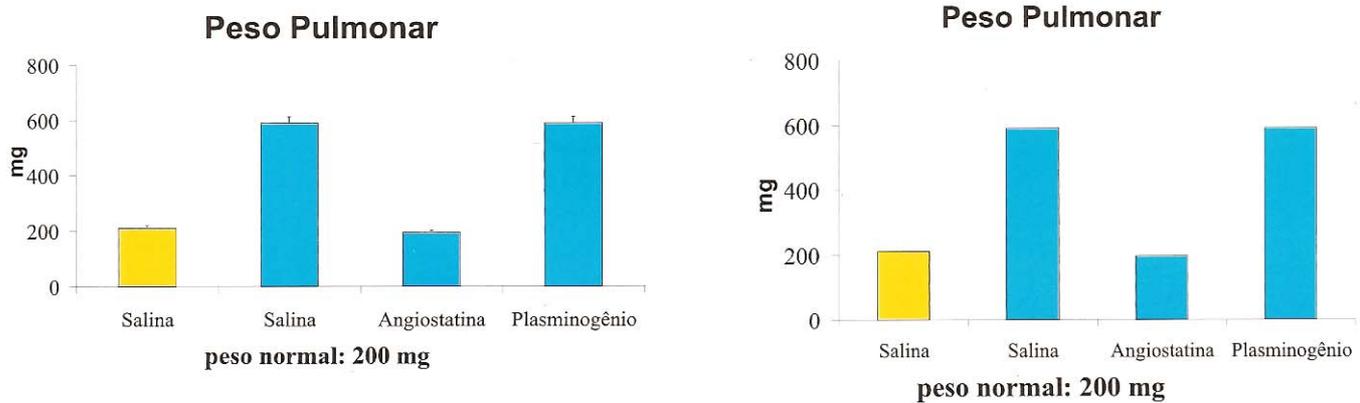


Figura 3: Inibição do crescimento de metástases pulmonares após remoção de tumor primário e tratamento sistêmico com soro ou urina de rato com tumor controle.

■ Tumor primário presente **■ Tumor primário removido**

Ratos que foram tratados com soro (A) ou urina (B) de ratos com tumor controles ou animais normais ou com solução salina depois de removido o tumor primário. Um grupo tinha esses tumores intactos. Depois de removido o tumor, metástases eram inibidas somente nos ratos tratados com soro ou urina dos ratos com tumor controle.

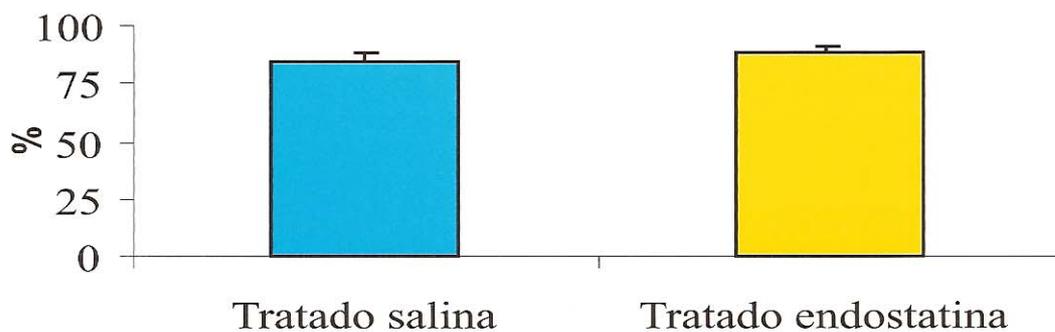


■ Tumor primário presente **■ Tumor primário removido**

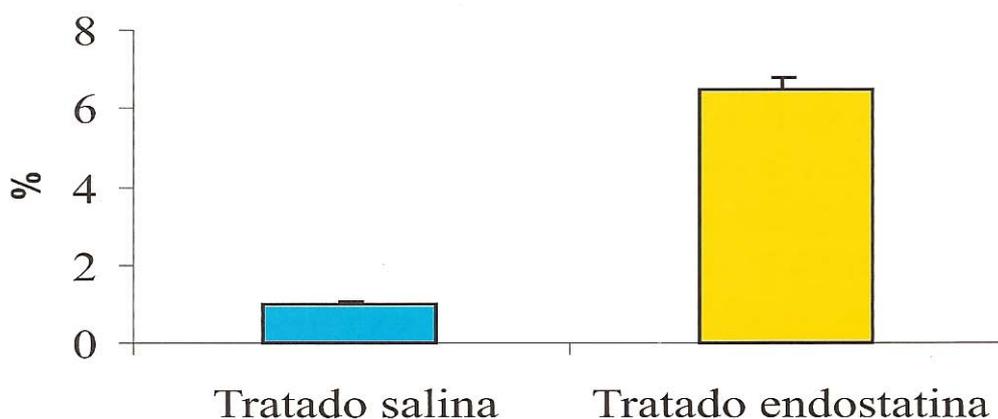
Figura 4: Tratamento sistêmico com angiostatina inibindo o crescimento de metástases após remoção de um tumor primário.

Depois de removido o tumor primário, ratos foram tratados com angiostatina purificada de fragmentos de plasminogênio humano, com plasminogênio humano ou solução salina. Ratos receberam 25 mg de plasminogênio ou angiostatina humana no dia da operação através de uma dose diária de 12,5 mg via injeção intraperitoneal. O tumor foi deixado intacto em um dos grupos de ratos. O número de metástases pulmonares na superfície e o peso pulmonar aumentaram nos ratos tratados com plasminogênio ou solução salina depois de removido o tumor. Em contraste, tratamento com angiostatina inibiu crescimento metastático tão efetivamente quanto o tumor primário. (12)

Proliferação



Apoptose



Angiogênese

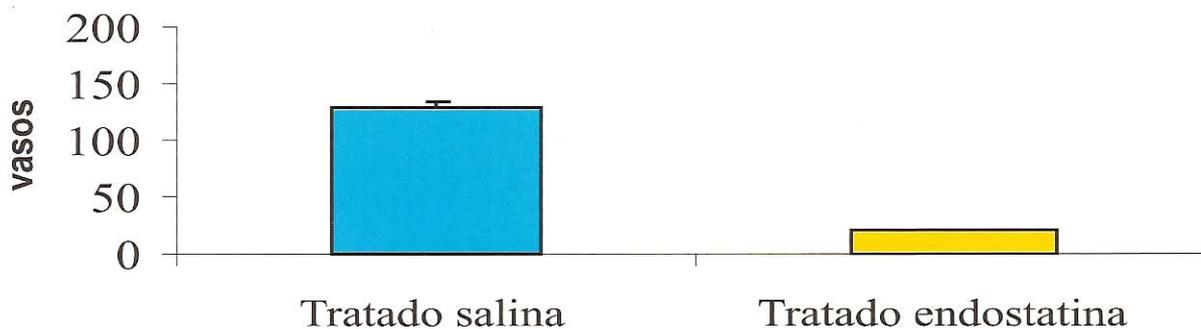


Figura 5: Resultados da endostatina na inibição da angiogênese e o aumento da apoptose em Tumor Primário.

Secções histológicas de tumores (Carcinoma Pulmonar de Lewis) tratados com solução salina versus endostatina foram analisados pela proliferação, apoptoses e angiogênese. Não existiu diferença significativa na proliferação. Em contraste, o índice apoptótico das células tumorais cresceu 7 vezes nos ratos tratados com endostatina. Angiogênese foi completamente suprimida em tumores residuais microscópicos em ratos com tratamento por endostatina. (11)

• Agradecimentos:

Ao Prof^o Dr. Carlos Roberto Douglas pelo inestimável estímulo; ao Sr. Dr. Dario O. Fauza, M.D pelos esclarecimentos e atenção dada a nós durante o trabalho; e à acadêmica Danielle Menosi Gualandro por sua colaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARINAGA, M. A surprising partner for angiostatin. *Science*, 238: 1831, 1999
2. BERLIM, T.; FOLKMAN, J.; BROWDER, T.; O'REILLY, M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390/27: 404-7, 1997
3. BLACK, W.R. & AGNER, R.C. Tumor regression after endostatin therapy. *Nature*, 391: 450, 1998
4. BUSSOLINO, F.; MANTOVANI, A.; PERSICO, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *TIBS*: 251-6, 1997
5. DOUGLAS, C.R. Mecanismo de oncogênese. In: DOUGLAS, C.R. *Patofisiologia Geral. Mecanismo da Doença*. 1 ed. Robe Editora. São Paulo, 2000, p.
6. FOLKMAN, J.; CHEN, C.; PARANGI, S. et. al. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Research*, 55: 4230-3, 1995
7. GATELY, S.; TWARDOWSK, P.; STACK, M.S. et. al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10868-77, 1997
8. KERBEL, R.S. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature*, 390: 335-6, 1997
9. LANNUTTI, B.J.; GATELY, S.; PALLER, A.S. et. al. Human angiostatin inhibits murine hemangi endothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Research*, 57: 5277-80, 1997
10. MAUCERI, H.J.; HANNA, N.N.; GATELY, S. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature*, 394: 287-91, 1998
11. O'REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y. et. al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277-85, 1997
12. O'REILLY, M.S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y. et. al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell*, 79: 315-28, 1994
13. PATTERSON, B.C. & SANG, Q.A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *The Journal of Biological Chemistry*, 272/46: 28823-4, 1997
14. ROWE, M.P. Starve the tumor save the patient. *Lancet*, 349: 108, 1997
15. SAPHIR, A. Angiogenesis: the unifying concept in cancer? *Journal of the National Cancer Institute*, 89: 1655-59, 1997
16. THANADAL, M.; RAMCHANDRAN, R.; VOLK, R. et. al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 59: 189-97, 1999
17. ZETTER, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Reviews Medical*, 49: 407-24, 1998