

ANGIOGÊNESE: O GATILHO PROLIFERATIVO

MAURO DE SOUZA LEITE PINHO¹

¹*Hospital Municipal São José, Joinville, Santa Catarina, Brasil*

PINHO MSL. Angiogênese: O Gatilho Proliferativo. *Rev bras Coloproct*, 2005;25(4): 396-402.

RESUMO: Os grandes avanços ocorridos na área da biologia molecular têm possibilitado uma melhor compreensão dos mecanismos de carcinogênese. Dentre estes, destaca-se a angiogênese como o processo através do qual as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para seu crescimento acelerado. Sabe-se hoje que a angiogênese resulta da liberação local pelo tumor de algumas proteínas com ação estimuladora para o desenvolvimento vascular, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Sucessivos estudos têm demonstrado uma significativa correlação entre os níveis séricos e teciduais destas proteínas e as características clínico-patológicas de diversos tumores, incluindo o câncer colorretal. Como consequência direta destes achados, a terapia anti-angiogênica, baseada na inibição destas moléculas, representa hoje uma das mais promissoras linhas de estudo em oncologia, em especial através do desenvolvimento de drogas baseadas em anticorpos monoclonais, como bevacizumab, cujos estudos clínicos iniciais realizados no tratamento do câncer colorretal têm demonstrado resultados altamente promissores, apresentando melhoras significativas nos índices de resposta tumoral e sobrevida dos pacientes.

Descritores: Cancer colorretal, angiogênese, biologia molecular

INTRODUÇÃO

Sabemos hoje que, para que uma célula evolua de seu estado normal até assumir as características de uma célula neoplásica, é necessária a ocorrência de uma série de mutações, envolvendo genes que expressem proteínas cuja ação esteja relacionada ao controle do ciclo celular. Caso esta ação seja no sentido de estimular a divisão celular, estes genes são genericamente denominados como oncogenes e caso tenham por função inibi-la serão considerados como genes supressores de tumor. Seja por função anormalmente

exacerbada dos oncogenes ou por inibição dos supressores, o resultado será a obtenção de uma célula que apresentará um ganho proliferativo em relação às demais, tornando-se insensível aos estímulos apoptóticos¹⁻⁴.

Entretanto, aparentemente isto não é suficiente para que esta célula dê origem a um tumor com volume detectável e capaz de ameaçar a vida do indivíduo. Para que um determinado grupo de células consiga manter um crescimento sustentado é necessário que exista uma fonte de suprimento sanguíneo específico e constante. Há muitas décadas foi percebido que os tumores apresentam uma vascularização bastante proeminente

Trabalho realizado pelo Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, Joinville, Disciplina de Clínica do Departamento de Medicina da UNIVILLE

Recebido em 08/12/2005

Aceito para publicação em 15/12/2005

em relação aos tecidos normais. Estes achados foram sempre considerados como uma conseqüência do processo inflamatório decorrente das áreas focais de necrose existentes na massa tumoral.

Existem suficientes evidências hoje de que na verdade a presença desta vascularização exacerbada é uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico. Isto se deve ao desenvolvimento de microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares situados próximos às células neoplásicas.

Embora os capilares sejam um tipo de tecido universalmente presente em nosso corpo, sendo sua extensão estimada em uma camada monocelular que cobriria uma quadra de tênis inteira (equivalente a 1000 m²), são estes formados por células endoteliais que podem ser consideradas entre aquelas que apresentam um baixo ritmo de divisões celulares entre as demais células do corpo, com um ciclo proliferativo que compreende centenas de dias, enquanto as células epiteliais, por exemplo, podem se dividir até duas vezes ao dia.

Assim sendo, a presença de um crescimento vascular acentuado em um tecido tumoral demonstra dois aspectos bastante relevantes. O primeiro deles é a existência de um forte estímulo para estas células endoteliais, capaz de alterar seu estado proliferativo normal. O segundo é a natureza local deste estímulo, uma vez que tal proliferação irá ocorrer apenas no segmento adjacente ao surgimento de um diminuto clone de células neoplásicas. A este crescimento vascular localizado denominamos angiogênese.

Grande parte do mérito referente ao atual estado de conhecimentos sobre a angiogênese deve ser atribuída a Judah Folkman⁵⁻⁶, o qual propôs no princípio da década de setenta a importante participação do desenvolvimento de microcirculação no processo de crescimento tumoral. Já naquela época, Folkman antecipava o futuro ao sugerir que uma importante linha de estudos na terapêutica antineoplásica estaria relacionada ao desenvolvimento de técnicas capazes de bloquear o surgimento desta neovascularização, a fim de impedir o crescimento tumoral.

Fase Pré-Vascular da Expansão Tumoral

Cerca de 95% dos tumores malignos humanos são carcinomas que se originam como diminutas lesões *in situ* que podem ser encontradas em epitélios como

pele, mucosa gastrointestinal, bexiga, próstata, mama ou colo uterino, podendo permanecer sem sinais evidentes de crescimento durante anos. Estudos demonstram que durante esta fase as células neoplásicas poderão já apresentar uma atividade proliferativa aumentada, não ocorrendo, no entanto, um aumento do volume tumoral devido ao mecanismo compensatório representado pela apoptose celular.

No caso particular do câncer colorretal, este mecanismo se torna ainda mais evidente devido à elevada incidência de lesões neoplásicas intramucosas, também denominadas como pólipos adenomatosos, os quais provavelmente em sua grande maioria permanecem durante muitos anos com crescimento virtualmente inexistente. Em alguns casos, no entanto, estes pólipos podem evoluir para um comportamento biológico mais agressivo, com crescimento rápido, com invasão da parede intestinal e tecidos vizinhos.

Numerosos estudos realizados ao longo das últimas duas décadas demonstraram fortes evidências de que esta modificação do padrão de crescimento tumoral é dependente do desenvolvimento de uma neovascularização específica, a qual ocorre em decorrência de diversos fatores locais estimulantes da angiogênese como a hipóxia e a elevação de CO₂ ou óxido nítrico (Figura-1)⁷⁻⁸.

Proteínas Relacionadas à Angiogênese

A presença dos fatores locais acima citados irá desencadear um processo de liberação de diversas proteínas, as quais atuam no processo de angiogênese e de sua ação estimulante sobre o tecido neoplásico (Figura-2). Estudos realizados utilizando o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF)⁹⁻¹¹ demonstraram que, além de uma elevada ação oncogênica, contribuindo para a transformação de fibroblastos normais em neoplásicos, esta proteína apresentava ainda uma grande capacidade de estimular o processo de angiogênese, sendo ambos revertidos após sua inativação pela adição de um anticorpo.

Estudos semelhantes identificaram outra proteína com potente ação angiogênica denominada como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), considerada de importante ação mitogênica sobre células endoteliais¹²⁻¹⁷, a qual é hoje relacionada a uma importante linha de terapêutica antineoplásica, como veremos adiante.

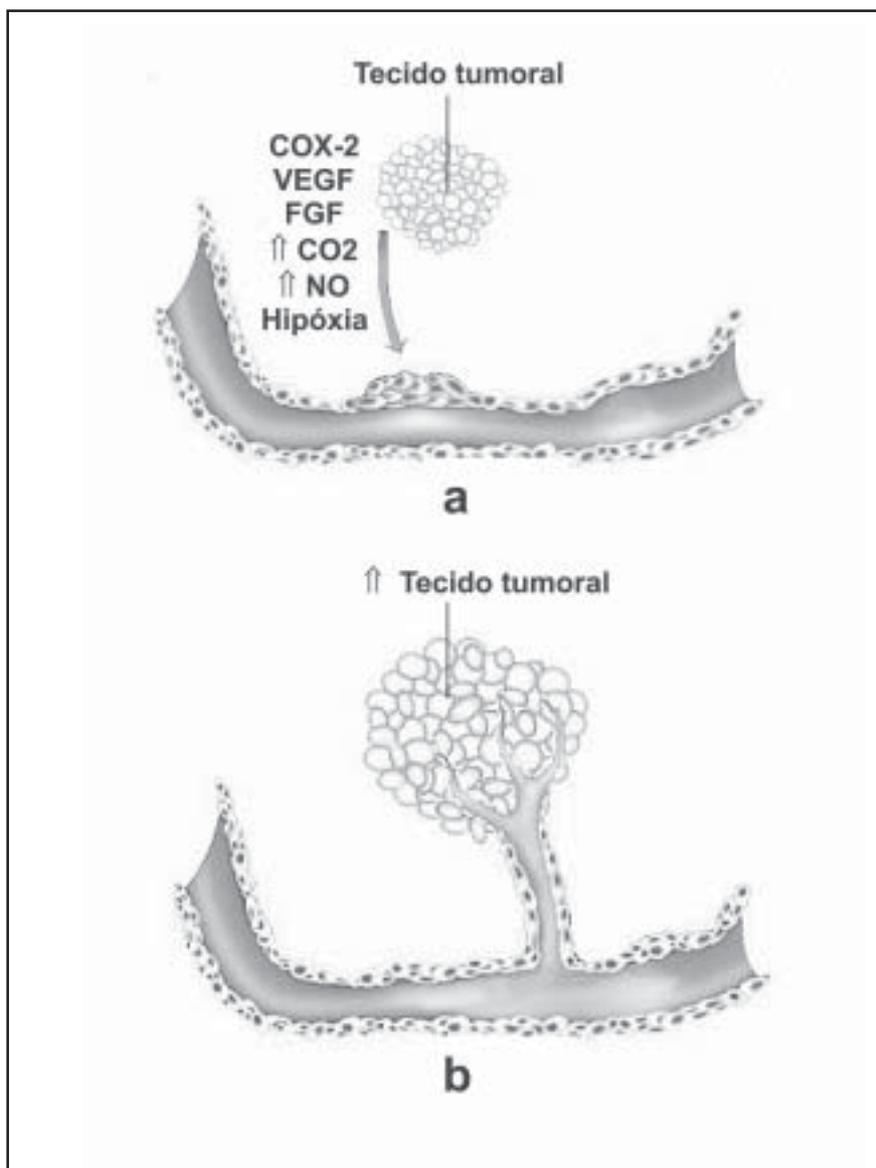


Figura 1 – Estímulos tumorais à angiogênese. (Adaptado de Miller K in *Disrupting VEGF signaling*, Astra Zeneca, 2002.

Ao contrário da ciclo-oxigenase-1 (COX-1), a qual é uma enzima usualmente expressa em tecidos normais e envolvida em diversas funções celulares, a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) é uma proteína expressa como resposta à presença de mediadores locais liberados em consequência de vários estímulos, fazendo parte de uma resposta inflamatória a estes. Além disto, diversos estudos demonstram que sua expressão nos tecidos colorretais está associada a fatores angiogênicos e formação de novos vasos no processo de carcinogênese¹⁸⁻²¹.

Posteriormente a estes agentes considerados como angiogênicos, foram identificadas algumas proteínas capazes de exercer ação oposta, como a angiostatina e a endostatina, as quais inibiriam a angiogênese ocorrida nos modelos experimentais acima citados²²⁻²³. É interessante notar que a ação inibidora destas proteínas restringe-se apenas à atividade angiogênica consequente à presença de tecido neoplásico, não exercendo qualquer influência negativa sobre a atividade proliferativa de células endoteliais normais.

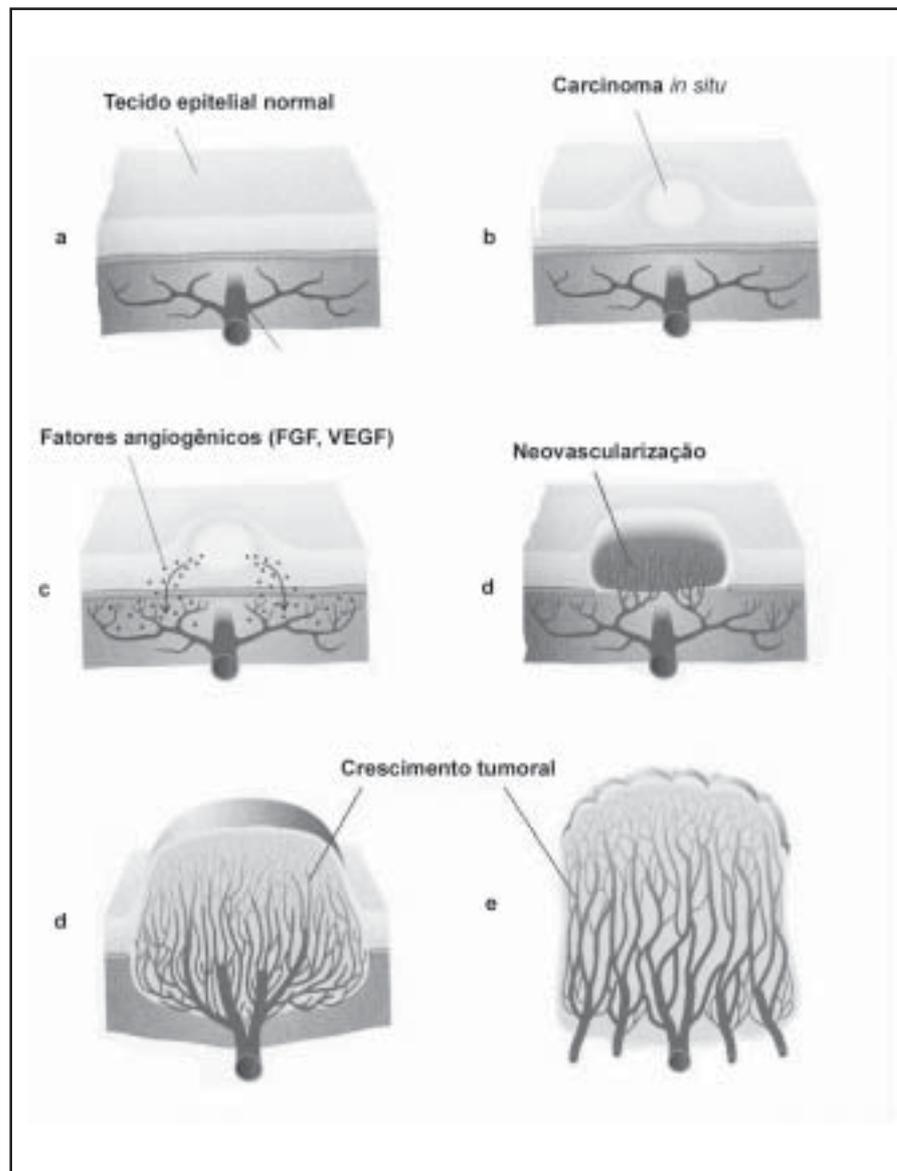


Figura 2 – Etapas da angiogênese. (Adaptado de Martin FS, in Bishop JM, Weinberg RA, 1996. *Scientific American Molecular Oncology*. Scientific American Inc: New York, p 29.)

Angiogênese e Metástases

Existem fortes evidências de que a angiogênese esteja relacionada não apenas ao crescimento tumoral, desempenhando ainda uma importante ação no processo de formação e desenvolvimento de metástases. Estudos experimentais demonstram ser bastante infrequente a formação de metástases a partir de tumores primários antes do desenvolvi-

mento de neovascularização, ocorrendo no entanto após esta uma facilitação da migração de células neoplásicas através da circulação sanguínea. Superando estes achados, diversos autores referem uma correlação positiva entre a microdensidade vascular e o risco de desenvolvimento de metástases em diversos tumores.

A proliferação vascular gerando uma rede de capilares com paredes endoteliais fragmentadas em

meio a um tecido formado por células neoplásicas com baixa adesividade entre si representa um fator favorecedor à penetração e migração celular através da corrente sanguínea. Além disto, existem evidências de que a capacidade destas células neoplásicas de liberar fatores angiogênicos contribui para a formação de metástases através da ativação de plasminogênio e colagenases contribuindo para a degradação da membrana basal endotelial.

Valor Prognóstico da Análise Angiogênica dos Tumores

A partir das evidências mencionadas acima, observa-se hoje uma grande atividade de pesquisa buscando relacionar a presença de fatores angiogênicos no tecido tumoral e seu prognóstico. Este exame, realizado na maior parte dos casos através de imunohistoquímica para a demonstração de proteínas como a VEGF e bFGF, pode ser realizado de forma rotineira em laboratórios de anatomia patológica e apresenta, segundo muitos relatos, um elevado valor prognóstico.

No que diz respeito ao câncer colorretal, dispomos hoje de fortes evidências de que os níveis tissulares e séricos de VEGF apresentam uma significativa correlação com os diferentes aspectos clínico-patológicos tumorais, como o tamanho da lesão, presença de invasão vascular, presença de metástases linfonodais, diferenciação tumoral e, em especial, com o prognóstico do paciente observado através de taxas de sobrevida após o tratamento.

Além disto, diversos estudos tem demonstrado que a determinação dos níveis séricos de VEGF pode ser utilizada como um importante marcador tumoral, apresentando uma sensibilidade diagnóstica superior à dosagem do antígeno carcinoembrionico (CEA), incluindo um valor prognóstico pré-operatório e uma forte correlação com o estado tumoral pós-operatório ou de acordo com a resposta à terapia adjuvante.

Em relação à COX-2, sua utilização como marcador prognóstico no câncer colorretal, os resultados são ainda tema de controvérsia. Embora os resultados obtidos em pesquisas nesta área sejam ainda conflitantes, parece consenso na literatura que a expressão desta proteína COX-2 está relacionada à angiogênese e progressão da doença, sendo sua inibição hoje um dos princípios já utilizados na prática clínica

como elemento repressor da atividade proliferativa da mucosa em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar.

Aplicações Terapêuticas Anti-Angiogênicas

A elevada consistência dos conhecimentos acumulados até o momento sobre a importância da angiogênese como fator primordial no desenvolvimento tumoral levou à consequente proposição de uma estratégia terapêutica anti-neoplásica baseada no desenvolvimento de medicamentos capazes de inibi-la, proporcionando uma redução do crescimento tumoral.

Diversas substâncias têm sido demonstradas como possíveis antagonistas à angiogênese, atuando sobre as várias moléculas que atuam como seus mediadores. Existem claras evidências, já há alguns anos, de que os inibidores da COX-2 como o celecoxibe e o rofecoxibe²⁰ possuem ação inibidora do desenvolvimento de pólipos em pacientes portadores de poliposes adenomatosas quando utilizados em doses elevadas e por prazos prolongados.

Outros estudos têm demonstrado resultados encorajadores através do uso da angiostatina e endostatina como bloqueadores da angiogênese e consequente redução do crescimento tumoral. Embora ainda em sua maioria na fase experimental, estes estudos têm ainda reforçado uma interessante hipótese formulada por Folkman, através da qual tumores primários, ao produzir estes fatores, poderiam contribuir para a inibição do desenvolvimento de metástases à distância. Desta forma, a ressecção destes tumores iria levar a uma redução dos níveis circulantes de angiostatina e endostatina, causando uma liberação da proliferação celular nos tecidos metastáticos e seu consequente crescimento.

Entretanto, dentre todas estas linhas terapêuticas, podemos hoje destacar o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti-VEGF como a aplicação clínica mais bem sucedida até o momento. Produzido comercialmente após rápida tramitação pelo órgão de controle americano (FDA), devido a seus resultados positivos bastante consistentes, este medicamento, denominado como Bevacizumab (Avastin®) é a primeira terapia aprovada com ação específica na inibição da angiogênese tumoral. Utilizada correntemente já na prática clínica, é hoje

considerada como droga de primeira linha na quimioterapia do câncer colorretal metastático por apresentar benefícios significativos na sobrevida e intervalo livre de doença quando associada a outros medicamentos como o 5-FU e leucovorin, irinotecan ou oxaliplatina²⁴⁻²⁷.

Assim sendo, existem fortes evidências de que a determinação dos níveis de VEGF tornar-se-á uma importante ferramenta na caracterização do

comportamento biológico tumoral. Além de fornecer uma informação prognóstica para o paciente, este procedimento representa o início de uma nova e revolucionária etapa na história do tratamento oncológico na qual a terapêutica será estabelecida de forma individualizada, baseada na identificação do perfil de proteínas expressas em cada tumor, possibilitando a utilização de medicações específicas mais eficientes e provavelmente menos tóxicas.

SUMMARY: Recent advances in molecular biology have contributed to a better understanding of mechanisms of carcinogenesis. Angiogenesis has been reported as a crucial process by the development of new tumour endothelial vessels with consequent proliferative stimulus mediated by expression of several proteins such as basic fibroblast growth factor (bFGF), ciclo-oxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Several studies have demonstrated a significant correlation between tissue and serum levels of these proteins and clinical-pathological aspects in several tumours, including colorectal cancer. Inhibition of these molecules has been suggested as an anti-angiogenic therapy, which is undertaken by development of drugs based on monoclonal antibodies, such as bevacizumab. Clinical studies regarding the use of these drugs have shown very encouraging results, with significant benefit in tumour response and patients survival.

Key words: Colorectal cancer, angiogenesis, molecular biology

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts e cols. Fundamentos da Biologia Celular, Artmed, 1999
2. Lodish e cols. Biologia Celular e Molecular, Revinter, 2002
3. Pinho M. Biologia Molecular do Câncer, Revinter, 2005
4. Rossi BM, Pinho M. Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião, Lemar, 1999
5. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285: 1182-1186. 6. Folkman F. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 409-416.
6. Li W, Xu RJ, Jiang LH, Shi J, Long X, Fan B. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. *Med Oncol.* 2005;22(1):63-70.
7. Wang L, Shi GG, Yao JC, Gong W, Wei D, Wu TT, Ajani JA, Huang S, Xie K. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2005;8(1):18-28.
8. Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001; 182: 298-304
9. Sezer O, Jakob C, Eucker J, Niemoller K, Gatz F, Wernecke K, Possinger K. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2001; 66: 83-88.
10. Straume O, Akslen LA. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. *Am J Pathol* 2002; 160: 1009-1019.
11. Akbulut H, Altuntas F, Akbulut KG, Ozturk G, Cindoruk M, Unal E, Icli F. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. *Cytokine.* 2002 Nov 24;20(4):184-90.
12. Broll R, Erdmann H, Duchrow M, Oevermann E, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Windhovel U. Vascular endothelial growth factor (VEGF)—a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? *Eur J Surg Oncol.* 2001 Feb;27(1):37-42.
13. Cascinu S, Graziano F, Catalano V, Staccioli MP, Barni S, Giordani P, Rossi MC, Baldelli AM, Muretto P, Valenti A, Catalano G. Differences of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression between liver and abdominal metastases from colon cancer. Implications for the treatment with VEGF inhibitors. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(8):651-5.
14. Celen O, Kahraman I, Yildirim E, Berberoglu U. Correlation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CEA with

- clinicopathological variables in colorectal cancer patients. *Neoplasma*. 2004;51(4):293-9.
15. Chin KF, Greenman J, Reusch P, Gardiner E, Marme D, Monson JR. Vascular endothelial growth factor and soluble Tie-2 receptor in colorectal cancer: associations with disease recurrence. *Eur J Surg Oncol*. 2003 Aug;29(6):497-505.
 16. Cubo T, Padilla D, de la Osa G, Palomino T, Garcia M, Pardo R, Martin J, Arevalo E, Hernandez J. Serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and its prognostic significance. *Med Clin (Barc)*. 2004 Feb 21;122(6):201-4.
 17. Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb 28;11(8):1105-8.
 18. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2004 Aug 15;10(16):2323-6.
 19. Fenwick SW, Toogood GJ, Lodge JP, Hull MA. The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastases. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):716-29.
 20. Rao M, Yang W, Seifalian AM, Winslet MC. Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2004 Jan;19(1):1-11.
 21. Peeters CF, de Geus LF, Westphal JR, de Waal RM, Ruiter DJ, Wobbes T, Oyen WJ, Ruers TJ. Decrease in circulating anti-angiogenic factors (angiostatin and endostatin) after surgical removal of primary colorectal carcinoma coincides with increased metabolic activity of liver metastases. *Surgery*. 2005 Feb;137(2):246-9.
 22. te Velde EA, Vogten JM, Gebbink MF, van Gorp JM, Voest EE, Borel Rinkes IH. Enhanced antitumour efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg*. 2002 Oct;89(10):1302-9.
 23. Zondor SD, Medina PJ. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Ann Pharmacother*. 2004 Jul-Aug;38(7-8):1258-64.
 24. Diaz-Rubio E, Schmolli HJ. The future development of bevacizumab in colorectal cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:34-45.
 25. Gordon MS, Cunningham D. Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:25-33.
 26. Hurwitz H, Kabbinavar F. Bevacizumab combined with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy regimens to treat colorectal cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:17-24.

Endereço para correspondência:

MAURO PINHO
Rua Palmares 380
Joinville, Santa Catarina
Cep. 89203-230