PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR NOS CARCINOMAS DE TIREÓIDE

THE ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN TUMOR

Clarissa Capp, Nadja Zennig, Simone Wajner, Ana Luiza Maia

RESUMO

O crescimento tumoral está diretamente relacionado com a neovascularização, a qual decorre do desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, secretados pelas células neoplásicas O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha papel chave na angiogênese tumoral, estimulando a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. Atua através da ligação a receptores tirosina quinase específicos: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e VEGFR-3. O aumento da expressão do VEGF e de seus receptores tem sido associado à progressão, metastatização e pior prognóstico em diversos tumores malignos. A compreensão das vias moleculares que envolvem o mecanismo de indução da angiogênese tumoral por fatores de crescimento como o VEGF aumentam as possibilidades de novas terapêuticas a serem utilizadas no tratamento de tumores malignos humanos. Evidências indicam um importante papel do VEGF nas neoplasias da tireóide e a utilização de inibidores do VEGF ou de seus receptores pode constituir um importante recurso terapêutico, já tendo sido utilizado em determinados tipos de tumores humanos. O presente artigo tem como objetivo fazer uma revisão da atuação do VEGF no crescimento tumoral com enfoque nas neoplasias malignas da tireóide.
Unitermos: *Angiogênese; fator de crescimento endotelial.*

ABSTRACT

The neoplasic process is directly related to neovascularization, an imbalance between pro-angiogenic and antiangiogenic factors. The vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a key role in tumor angiogenesis, stimulating proliferation, migration and survival of endothelial cells. VEGF acts through binding to specific tyrosine kinase receptor: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR and VEGFR-3. Increased expression of VEGF and its receptors have been associated with progression, metastasis and worse prognosis in human malignant tumors. Understanding molecular pathways of tumor angiogenesis related to growth factors such as VEGF is a crucial step on developing new treatment options. Evidence indicates an important role of VEGF in thyroid cancer and inhibition of VEGF or its receptors may constitute an important therapeutic resource, particularly for those patients with metastatic diseases. This aim of this article is to review the role of VEGF in tumor growth, focusing on thyroid malignancies.
Keywords: *Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor*

Revista HCPA 2009;29(1):51-59

A angiogênese constitui um importante mecanismo no desenvolvimento tumoral, sendo responsável pelo aporte nutricional às células neoplásicas em proliferação e estabelecendo condições favoráveis para a disseminação metastática. É um processo complexo com vários estágios que envolvem o remodelamento da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais, diferenciação capilar e anastomose (1,2).

Várias moléculas estimuladoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento ligados à heparina, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de necrose tumoral (TNFα e TNFß) e fator de transformação de crescimento (TGFα). Dentre todos estes, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente mitógeno envolvido na angiogênese. Sua atuação parece estar relacionada com a regulação endógena deste processo (3-6).

O VEGF atua através de sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial. Recentemente, estudos baseados no mecanismo molecular dessas vias de ativação e inativação dos fatores de crescimento tumoral que utilizam receptores tipo tirosina quinase têm demonstrado uma promissora possibilidade terapêutica. O presente artigo tem como objetivo fazer uma revisão da atuação do VEGF no crescimento tumoral com enfoque nas neoplasias malignas da tireóide.

Angiogênese: características gerais

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sangüíneos a partir de vascularização pré-existente (7), sendo um evento essencial para o desenvolvimento normal e a homeostase dos tecidos. Em condições fisiológicas atua na embriogênese, no desenvolvimento tecidual, na ovulação, na formação do corpo lúteo e no processo de cicatrização (8,9). A angiogênese patológica, por sua vez, ocorre em uma variedade de transtornos, sejam eles caracteri-

Setor de Tireóide, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
Contato: Ana Luiza Maia, e-mail: almaia@ufrgs.br, (Porto Alegre, RS, Brasil)

zados por neovascularização, como observado na retinopatia proliferativa, regeneração macular relacionada com a idade, artrite reumatóide, psoríase, diabetes mellitus, crescimento tumoral e disseminação metastática (10,11). A angiogênese contribuiria para o processo metastático facilitando o desprendimento de células neoplásicas no interior dos vasos sangüíneos neoformados. Estima-se que 4 % da superfície vascular intratumoral seja ocupada por células malignas, formando os chamados "vasos mosaico". Cerca da metade dessas células se desprenderia para a circulação, resultando descamação de até um milhão de células por grama de tumor por dia (12,13). Em contraste com o processo ordenado, regulado e autolimitado da vascularização normal, a angiogênese patológica é um processo onde a multiplicação vascular ocorre de modo descontrolado e contínuo.

O pesquisador Judah Folkman foi um dos pioneiros a sugerir, na década de setenta, que o crescimento dos tumores seria angiogênese-dependente. O próprio tumor induziria neoangiogênese por produzir fatores pró-angiogênicos. Propôs ainda a importante participação do desenvolvimento da microcirculação no processo de crescimento tumoral. As idéias de Folkman se baseavam em estudos de um pequeno número de investigadores, como Algire e Chalkley (1945) (14), Greenblatt, Shubik (1968) (15) e Warren (1966) (16) que atribuíam à angiogênese o pré-requisito para o crescimento neoplásico.

Numerosos estudos realizados ao longo das últimas duas décadas demonstraram fortes evidências de que a modificação do padrão de crescimento tumoral é dependente do desenvolvimento de uma neovascularização específica, que ocorre em decorrência de diversos fatores locais estimuladores da angiogênese (17). Entre esses, destacamos o fator de crescimento fibroblástico (bFGF), um dos mais potentes peptídeos angiogênicos conhecidos, que apresenta importante atividade mitogênica e quimiotáxica para células endoteliais, fatores de crescimento ligados à heparina, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNFα e TNFß), moléculas de adesão como integrinas e caderinas, fator de transformação de crescimento (TGFα), interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinases (MMPs), fator indutor de hipóxia (HIF), ciclooxigenase 2 (COX 2) e as angiopoietinas 1 e 2 (ang-1 e ang-2) (5,4). Estes fatores são liberados pelas células tumorais, células endoteliais ou pela matriz extracelular.

O estímulo angiogênico é acompanhado da supressão dos inibidores locais da angiogênese, denominados fatores anti-angiogênicos, que protegem o endotélio vascular do estímulo proliferativo. Vários são esses fatores já descritos: fator plaquetário 4 (PF4), fator de transformação de crescimento (TGF-β), inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3), interferon alfa (α-IFN), prolactina (fragmento 16 kDa), angiostatina (fragmento 38 kDa do plasminogênio), trombospondina-1 (TSP-1), interleucina 10 (IL10) e endostatina (9).

Dentre todos os fatores envolvidos na angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha um papel essencial tanto nos processos fisiológicos como patológicos.

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF é membro de uma família de citocinas que exercem funções críticas na angiogênese fisiológica e patológica e na linfangiogênese (18). Estudos iniciais descreveram a purificação parcial de uma proteína capaz de induzir permeabilidade vascular em pele de cobaia (19). Essa proteína foi nomeada fator de permeabilidade vascular (VPF) e foi apresentada como reguladora específica de permeabilidade de vasos sanguíneos tumorais.

Em 1989, Ferrara e cols. relataram a purificação e sequenciamento de um mitógeno de célula endotelial específico que chamaram de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). No mesmo ano, Connolly e cols descreveram a clonagem do cDNA do VPF (4). Estudos subsequentes demonstraram que VEGF e VPF eram a mesma molécula. No final da década de 80, o VEGF foi caracterizado como um fator potente para a proliferação vascular, difusível e específico para células do endotélio. Essas definições conduziram à hipótese de que esta molécula desempenharia um papel ímpar na regulação do crescimento vascular, fisiológico ou patológico (4).

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas da qual fazem parte o fator de crescimento placentário (PGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E VEGF-F (18,20,21) (Figura 1). Eles compartilham uma estrutura comum de oito resíduos de cisteína no domínio de homologia do VEGF. Destes, o VEGF-A, ou apenas VEGF, é o fator mais bem estudado e compreendido (22). Essa glicoproteína é expressa em diversas isoformas a partir de *splicing* alternativo $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$, e $VEGF_{206}$. Entre essas, as principais são $VEGF_{121}$ e $VEGF_{165}$ (6). A ativação do VEGF desencadeia diversas rotas de sinalização intracelular que resultam em proliferação, sobrevivência, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais, assim como sua atuação no

aumento da permeabilidade vascular (23). A transcrição do mRNA do VEGF pode ser induzida pela secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo, PDGF, EGF, TNF-α, TGF-α e IL-1.

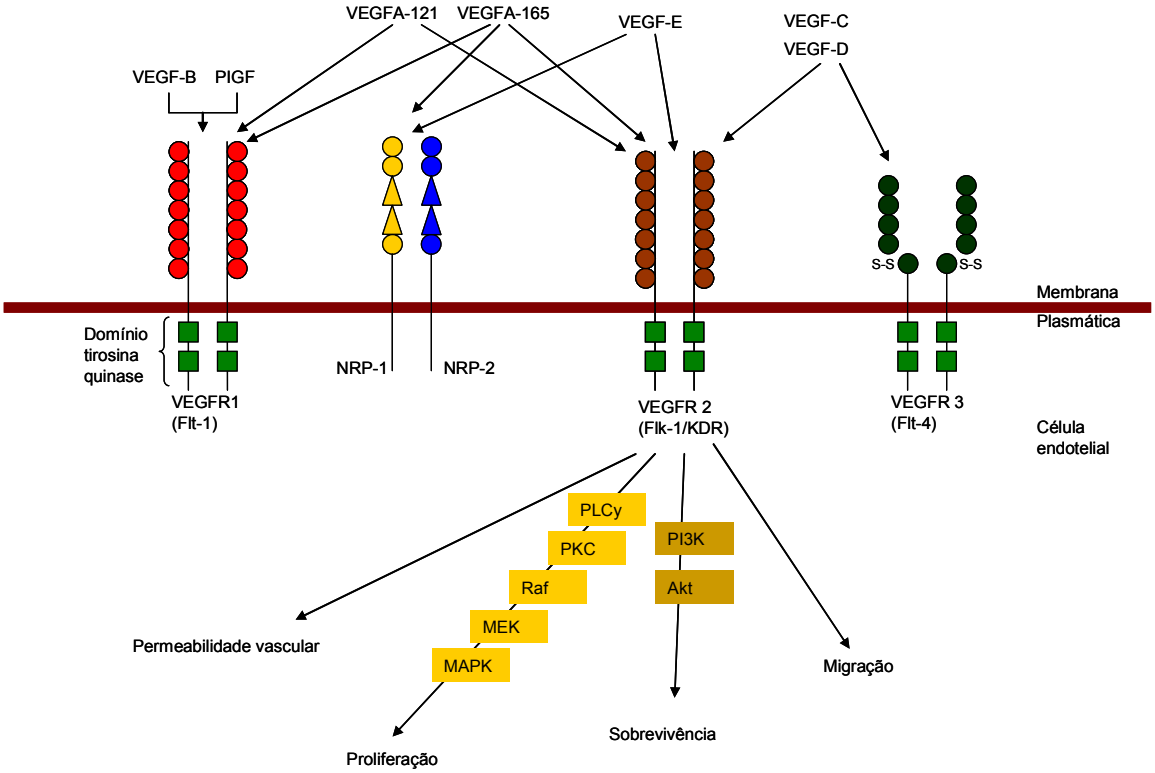

Figura 1 - Representação esquemática da ligação das diferentes moléculas do VEGF a seus receptores e ativação das diferentes rotas bioquímicas envolvidas no processo angiogênico.

O VEGF induz a angiogênese atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase. Eles são conhecidos como VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 ou Flt-1) (24), VEGFR-2 (fetal liver kinase, Flk-1 ou KDR) e VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, Flt4) (5). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos nas células do endotélio vascular. VEGFR-2 e VEGFR-3 são os principais receptores da sinalização nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente. Além desses, também atuam como receptores para alguns membros da família VEGF as neuropilinas 1 (NRP-1) e 2 (NRP-2) que são receptores para semaforinas (proteínas de membrana que agem no crescimento do cone axonal) (22).

Estes receptores têm diferentes propriedades físicas e biológicas e possuem atividade tirosina quinase (TK). As proteínas tirosina quinase (PTK) são enzimas que catalizam a transferência do grupo fosfato da adenosina tri-fosfato (ATP) para resíduos tirosina de outras proteínas ou polipeptídios (25), um processo denominado fosforilação. Essas enzimas são importantes mediadoras no processo de transdução do sinal, levando à proliferação, diferenciação, migração, metabolismo e morte celular programada. A fosforilação dos resíduos tirosina nas proteínas alvo é essencial para manutenção da homeostase celular. PTKs formam uma diversificada e extensa superfamília de proteínas, que incluem os receptores transmembrana tirosina quinases (RTK) e enzimas citoplasmáticas, também conhecidas como não-receptor tirosina quinases (NRTK). Os RTKs possuem uma estrutura similar: um sítio de ligação extracelular, uma região transmembrana, e uma porção citoplasmática contendo um domínio tirosina quinase (25).

Mecanismo de Ação

A ativação dos receptores tirosina quinase é tipicamente iniciada pela ligação da molécula ativadora (por exemplo, hormônio ou fator de crescimento) no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz uma dimerização dos receptores, resultando na autofosforilação dos resíduos tirosina dentro do domínio citoplasmático, onde o primeiro substrato deste domínio vem a ser o próprio receptor (26).

No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o VEGF promove a angiogênese não foram ainda totalmente desvendados. A

ligação do VEGF aos seus diferentes receptores inicia diferentes vias de sinalização intracelular. Esta ligação leva à dimerização do receptor, uma autofosforilação de resíduos tirosina que conduzem à ativação da transdução de sinal de moléculas como fosfolipase Cy (PLCγ), fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt/PKB), Ras, tirosina-quinases coativadoras de receptores esteroidais (Src) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A ativação de fosfolipase Cy (PLCy) leva a liberação de cálcio (Ca^{2+}) e ativação da proteína quinase C (PKC). Essa, por sua vez, estimula as vias Raf/MAPK/quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que aumentam a proliferação celular. A mobilização de Ca^{2+} e a ativação de PKC são a chave da sinalização da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF através da ativação da atividade endotelial da síntese do óxido nítrico (5,6) (Figura 1).

VEGF e Crescimento tumoral

O processo de progressão tumoral, da geração de uma célula neoplásica ao estabelecimento de metástases à distância, caracteriza-se por alterações cumulativas no material genético das células em transformação. Essas alterações são traduzidas, por exemplo, na perda do controle sobre a divisão celular, na imortalização e na aquisição da capacidade invasiva (27,10).

A idéia de que o processo neoplásico seria dependente de neovascularização iniciou-se na década de 60. Experimentos demonstraram que apesar das anormalidades genéticas que promovem o crescimento tumoral, a sobrevida das células neoplásicas dos tumores sólidos não seria possível a partir do diâmetro de 2 a 3 mm não fosse a ativação angiogênica. Até este diâmetro os tumores recebem oxigênio e nutrientes por difusão simples dispensando a irrigação por vasos sangüíneos próprios. A partir deste tamanho, na ausência de vascularização neoformada, o tumor deixa de crescer e ocorre morte celular induzida pela hipóxia e pela formação de óxido nítrico (10,23). Em 1971, Folkman e cols. difundiram o termo angiogênese para nomear o processo complexo em que são formados novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Eles isolaram um fator em tumores humano denominado *tumor angiogenesis factor* (TAF) que demonstrou atividade mitogênica às células endoteliais, estimulando a rápida formação de novos capilares. Estas observações propuseram que a angiogênese seria um pré-requisito para o crescimento neoplásico e não um efeito colateral deste (28). Assim surge a idéia de que o TAF seria um elemento produzido pelas células tumorais e que a sua inativação poderia ter grandes aplicações terapêuticas. A angiogênese associada aos tumores sólidos seria um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro (28). Uma vez deflagrada a angiogênese, o suprimento adequado de oxigênio e nutriente permitiria o crescimento e a invasão tumorais (29).

Evidências sugerem que a angiogênese não só pode assegurar o crescimento tumoral pelo suprimento de mais nutrientes, mas também pode agir através de efeitos parácrinos das células endoteliais (9). As células endoteliais liberam fatores de crescimento que induzem a proliferação celular tumoral, sugerindo uma interação entre as células tumorais e as células endoteliais, na qual as primeiras liberam substâncias que estimulam as células endoteliais e, em troca, essas liberam substâncias que promovem o crescimento do tumor (27).

A expressão do fenótipo angiogênico, a partir de um subgrupo de células tumorais, demarca duas fases do desenvolvimento neoplásico: pré-vascular (1) e vascular (2).

1. A fase pré-vascular é caracterizada pelo diâmetro restrito do tumor (entre 2 a 3 mm) e limitação da população celular (< 10^6 células). A população celular é mantida por difusão de 0_2 e nutrientes através do espaço extracelular. A ausência de angiogênese impede a expansão do carcinoma *in situ* ou das micrometástases quiescentes, independente da capacidade de replicação celular – há um equilíbrio entre a proliferação e apoptose celular. Estas lesões são assintomáticas e clinicamente indetectáveis (28).

2. A fase vascular caracteriza-se pela formação de novos vasos capilares e rápida proliferação celular neoplásica (30). O crescimento neoplásico requer novos capilares e a perfusão passa a ser o mecanismo de aporte de oxigênio, nutrientes e via de eliminação de metabólitos. A maioria dos tumores torna-se clinicamente detectável somente após a neovascularização.

Durante a atividade angiogênica tumoral, um ou mais fatores pró-angiogênicos são liberados pelas células tumorais, difundindo-se através dos tecidos e, alcançando a rede vascular adjacente, desencadeando uma sequência de eventos. As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e ao VEGF, degradação da membrana basal por metaloproteinases, perda das junções entre as células endoteliais pela ação do fator ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento, recrutamento de células periendoteliais (31).

Vários mecanismos levam à indução da síntese do VEGF. A expressão do RNAm do VEGF é altamente induzida por condições de hipóxia, via fator indutor de hipóxia (HIF-1α). Esse fator de transcrição regula a expressão de mais de 70 genes implicados na angiogênese, na glicólise anaeróbica, na sobrevivência, proliferação e na apoptose celular (32). Baixas concentrações de oxigênio indicam a necessidade de vasos sangüíneos adicionais para fornecer oxigênio e nutrientes aos tumores em crescimento. O aumento da atividade do HIF-1 está correlacionado com o grau de angiogênese tumoral (33). De fato, o aumento da expressão do VEGF está associada com a progressão tumoral e um pior prognóstico em diversos tumores, como os carcinomas colorretal (34), gastrintestinal, (35), de mama (36), de próstata, de cabeça e pescoço (37,38), renal (39), de pulmão (40,41), de ovários (42), de colo uterino (43) e melanoma (44). Estudos recentes também descrevem a expressão aumentada do VEGF nos tumores da tireóide (45).

VEGF e tumores da tireóide

O câncer de tireóide, a neoplasia maligna mais comum das glândulas endócrinas representa cerca de 0,6 e 1,6% de todos os carcinomas que acometem os homens e as mulheres, respectivamente (46). As neoplasias da tireóide compreendem diferentes tipos histológicos e características clínicas distintas. O comportamento biológico destes tumores é muito variado, compreendendo formas de baixo potencial letal até formas extremamente agressivas e de alta mortalidade.

Os carcinomas de tireóide são classificados histologicamente em quatro grupos: papilar, folicular, medular e indiferenciado ou anaplásico. Os carcinomas papilífero e folicular, responsáveis por pelo menos 94% dos carcinomas de tireóide, são considerados carcinomas diferenciados (CDT), uma vez que mantêm uma semelhança estrutural e funcional com o tecido tireoidiano normal. O carcinoma medular de tireóide (CMT), tumor neuroendócrino originário das células parafoliculares, corresponde a 5% dos casos, e o carcinoma anaplásico que deriva da desdiferenciação dos CDT é responsável por aproximadamente 1% dos carcinomas de tireóide (47).

O CMT tem como principal produto secretório a calcitonina. Apresenta-se como tumor esporádico (75-80%) ou na forma hereditária (20-25%) (48). Na forma familiar, é um dos componentes de uma síndrome genética de herança autossômica dominante, apresentando-se isoladamente, como carcinoma medular de tireóide familiar (CMTF) ou como parte das síndromes de neoplasia endócrina múltipla (NEM) 2A ou 2B (49,50). O proto-oncogene *RET*, um acrônimo para *REarranged during Transfection*, foi identificado em 1985 por Takahashi e cols, e é o gene causador do CMT (51,52). O gene *RET* codifica um receptor do tipo tirosina quinase, e seu principal ligante é o fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (GDNF, *glial cell-derived neurotropic growth factor*). O complexo ligante-receptor interage com o RET e induz a dimerização, com a conseqüente ativação da quinase, autofosforilação e início da transdução do sinal, que promove a sobrevivência neuronal, além da diferenciação e da migração das células da crista neural (53,54). A porção extracelular complexa-se com co-receptores de alta-afinidade para o glicosil-fosfatidil-inosotol (GPI), conhecidos como GFRα-1, para formar um complexo receptor multimérico com o qual os ligantes específicos, no caso o GDNF interagem. Mutações de ponto no RET provocam um efeito de "ganho de função" que causam, por sua vez, uma ativação descontrolada da atividade TK do receptor.

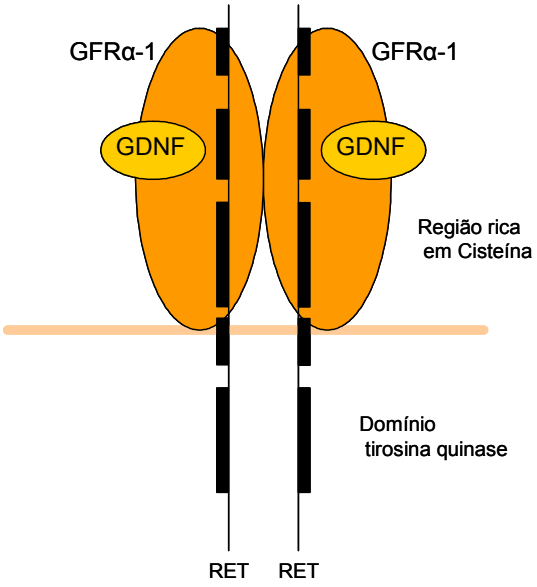

Figura 2 - A proteína RET é um receptor caracterizado por 3 regiões principais: um domínio extracelular onde se dá a ligação com o ligante GDNF; um domínio transmembrana; e uma porção intracelular contendo o domínio tirosina quinase (TK).

Evidências demonstram que o VEGF e seus receptores possuem um importante papel nas doenças da tireóide, não somente na doença de Graves, tireoidite, bócio, mas também nos carcinomas da tireóide (55-59). O aumento da expressão do mRNA e da proteína VEGF já foram identificados nos diferentes tipos de carcinomas da tireóide tanto *in vivo* quanto *in vitro* (3), sendo possivelmente modulado pelo hormônio estimulador da tireóide (TSH, *thyroid-stimulating hormone*) (60). Sua expressão parece estar correlacionada com o tamanho, a propagação e a recorrência dos tumores

tireoidianos (45,60,61). Em carcinomas papilares da tireóide, por exemplo, o aumento do nível de VEGF tem sido identificado como um marcador de metástases à distância (62).

Jebreel e cols (2007) também demonstraram a expressão do VEGF e de seus receptores, VEGFR-1 e VEGFR-2, em tumores benignos e malignos da tireóide. Neste estudo, a distribuição e a intensidade do VEGF estavam aumentadas nos adenomas foliculares e no carcinoma papilar em comparação com as doenças autoimunes, como doença de Graves e tireoidite de Hashimoto. Outros estudos demonstram ainda que pacientes com metástases à distância possuem níveis séricos de VEGF mais elevados do que pacientes em remissão, mas pacientes com metástases locais não demonstram qualquer aumento dos níveis do VEGF quando comparados a pacientes em remissão (63,64). A expressão do VEGF pode ainda aumentar a expressão de outros fatores angiogênicos como VEGF-C e angiopoietina-2.

Dados sobre a correlação entre VEGF e seus receptores e o CMT ainda são escassos na literatura, uma vez que a maioria dos estudos com enfoque no papel do VEGF em tumores de tireóide são referentes aos carcinomas diferenciados. Bunone e cols. (3) demonstram uma expressão elevada do VEGF em 50% das amostras de CMT. Este estudo demonstra ainda que a expressão das isoformas $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, e $VEGF_{165}$ do VEGF estão aumentadas no tumor primário sugerindo que tumores de tireóide secretem preferencialmente as isoformas biologicamente mais ativas. A expressão do VEGFR-2 foi aproximadamente 70% maior quando comparado com o tecido normal. De forma interessante, as metástases para linfonodos de CMT apresentavam um aumento maior do VEGF quando comparado com o tumor primário (3).

A alteração dos níveis do VEGF, combinada com a perda progressiva da expressão de inibidores de VEGF, como TSP-1, pode determinar um fenótipo angiogênico, aumentando o potencial metastático do carcinoma de tireóide (60). Análise de amostras de CMT (3) demonstrou uma diminuição de 67% na expressão da TSP-1 quando comparada com tecido tireoidiano normal. Os mesmos autores descrevem também uma diminuição ainda mais significativa nas amostras de tecido metastático do mesmo tumor.

A busca de tratamentos alternativos para os carcinomas tireoidianos que não respondem aos recursos tradicionais como a cirurgia, a iodoterapia, a radioterapia e quimioterapia, vem sendo intensificada na última década com base em novos conhecimentos da biologia molecular destes tumores. O aumento da expressão de vários oncogenes, a ativação descontrolada de receptores tirosina quinase e de suas vias de sinalização e a inibição da apoptose programada são hoje conhecidas na formação dos tumores, bem como na sua progressão, angiogênese e formação de metástases (65).

Novos tratamentos

Ao longo das últimas duas décadas, os mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer começaram a ser elucidados. A ativação descontrolada do receptor tirosina quinase, de moléculas sinalizadoras da cascata de sinalização e a inibição da apoptose são exemplos destas novas descobertas (66).

O desenvolvimento de anticorpos anti-VEGF e outras moléculas capazes de inibir o sistema VEGF/receptor VEGF fornecem evidências diretas da participação do VEGF na angiogênese e crescimento tumoral. Em experimentos utilizando anticorpos contra VEGF, Kim e cols (1993) demonstraram que um anticorpo monoclonal específico para VEGF inibia fortemente o crescimento de tumores a partir de células tumorais humanas injetadas em camundongos. Embora a maioria dos estudos tenha se concentrado na inibição da atividade de VEGF logo após a inoculação das células tumorais em animais, anticorpos anti-VEGF pareceram inibir o crescimento e as metástases em tumores já estabelecidos (67).

A inibição do VEGF via bloqueio de seus receptores representa um novo enfoque para a terapia contra o câncer, podendo ser utilizada para causar regressão de vasos sanguíneos imaturos, característicos dos tumores e reduzir a permeabilidade vascular de modo a diminuir a pressão intratumoral, com isto diminuindo a probabilidade de metastatização. A inibição do VEGF sobre a vascularização tumoral, em princípio, não afeta os vasos normais, já maduros e que, portanto, não dependem do VEGF para sua sobrevivência. Essas observações sugerem que a inibição do VEGF poderia ser um enfoque terapêutico racional para uma ampla variedade de tipos de tumores (68-70).

Estudos recentes com novas drogas, que inibem o VEGF e seus receptores em tumores tireoidianos têm demonstrado bons resultados (71). Alguns destes novos compostos são inibidores multiquinase, ou seja, inibem uma variedade de diferentes receptores tipo tirosina quinase. O RET, assim como o VEGF, tem sido o alvo destas drogas que inibem a atividade quinase *in vitro* e *in vivo*. Entre estes, duas pirazolo-pirimidinas, PP1 e PP2, e uma anilinoquinazolina, Vandetanibe (ZD6474, AstraZeneca), parecem prevenir a transformação mediada pelo RET. Estas novas drogas podem ser capazes de inibir a autofosforilação do RET/PTC e do RET/MEN2, bloqueando oncoproteínas, revertendo a

morfologia transformada, proliferação autônoma e crescimento celular. O Vandetanibe também é um inibidor do VEGFR-2. Carlomagno e cols (2002) demonstraram que em cultura de células e em tumores enxertados em ratos o Vandetanibe inibe a fosforilação do oncogene RET/PTC no câncer papilífero impedindo o crescimento do tumor (72,73).

Outros estudos clínicos que utilizam a inibição dos receptores tirosina quinase, como os do RET e do VEGF, em pacientes com câncer de tireóide também estão em desenvolvimento. No ano de 2008 foram publicados os primeiros resultados dos estudos clínicos baseados na utilização destas novas drogas (www.clinicaltrials.gov). Eles incluem Imatinibe (Glivec, Novartis), Gefitinibe (Iressa; Astra Zeneca), Axitinibe (AG-013736, Pfizer), Sorafenibe (Nexavar, Bayer), motesanibe (AMG 706, Amgen) e Sunitinibe (Sutent, Pfizer) (74).

Neste cenário, VEGF e RET parecem ser, particularmente, alvos promissores para a terapia molecular dos carcinomas de tireóide, especialmente para o CMT, uma vez que não existe tratamento sistêmico eficaz para a doença metástatica (75,76).

REFERÊNCIAS

1. Fox SB, Gatter KC, Harris AI. Tumor angiogenesis. J Pathol. 1996; 179:232-237.
2. Souza GFM, Freitas RA, Miranda JL. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. Cienc Odontol Bras 2007;10(1):12-8.
3. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butó S, Collini P, Pilotti S et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. Am J Pathol. 1999; 155(6):1967-76.
4. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat Rev Cancer. 2002; 2:795-803.
5. Pourgholami MH, Morris DL. Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008; 6:343-7.
6. Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. N Engl J Med. 2008. 358:2039-49.
7. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997; 386:671-4.
8. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov. 2007; 6(4):273-86.
9. Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med. 1995; 333:1757-63.
10. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990; 82:4-6.
11. Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. Int J Exp Pathol 2007; 88: 271-7.
12. Folkman J. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(2):398-400.
13. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. ProcNatl Acad Sci USA 2000; 97(26):14608-13.
14. Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo.* I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic implants. J Natl Cancer Inst.1945; 6:73-85.
15. Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. J Natl Cancer Inst.1968; 41:111-24.
16. Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. Lab Invest. 1966; 15(2):464-78.
17. Karamysheva AF. Mechanisms of Angiogenesis. Biochem. (Moscow) 2008; 73(7):751-62.
18. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endotelial grouwth factor: a critical cytokine in tumour angiogenesis and a potencial target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol. 2002; 20:4368-80.
19. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 1983; 219:983.
20. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptor. Nat Med. 2003; 9:669-79.
21. Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A 165. Biochem. 2005; 44: 8858-64.
22. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. FEBS Lett. 2006; 580:2879-87.
23. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol. 2005; 23:1011-27.
24. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res. 2006; 312:549-60.
25. Manash KP, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase: Role and significance in Cancer. Int J Med Sci. 2004; 1:101-15.
26. Zwick E, J Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer

intervention strategies. Endocr Relat Cancer. 2001; 8:161-73.

27. Meurer L. Densidade microvascular e expressão imunoistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

28. Tarta C. Análise digital de imagem e estereologia da angiogênese em adenomas e no adenocarcinoma colorretal invasivo de submucosa [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

29. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971; 285:1182-6.

30. Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, et al. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. Cancer 1994; 74:2245-50.

31. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. Nat Med 2003; 9:685-93.

32. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc Res. 2005; 65:550–63.

33. Zagzag D. et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. Cancer. 2000; 88:2606-18.

34. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G. et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2003; 21:60-5.

35. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer Res. 1993; 53(19):4727-35.

36. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of Breast Cancer. J Clin Oncol. 2005; 23:1782-90.

37. Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg. 1997; 174(5):513-7.

38. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, et al. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. J Clin Invest. 1993; 91(1):153-9.

39. Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2005; 23:1028-43.

40. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. Histol Histopathol. 2004; 19:37-42.

41. Eriksson P, Brattström D, Hesselius P, Larsson A, Bergström S, Ekman S, et al. Role of circulating cytokeratin fragments and angiogenic factors in NSCLC patients stage IIIa-IIIb receiving curatively intended treatment. Neoplasma. 2006; 53(4):285-90.

42. Duncan TJ, Al-Attar A, Rolland P, Scott IV, Deen S, Liu DT, et al. Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? Clin Cancer Res. 2008; 14(10):3030-5.

43. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst. 1995; 87(16):1237-45.

44. Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. J Clin Oncol. 2001; 19: 577-83.

45. Vieira JM, Santos SR, Espadinha C, Correia I, Vag T, Casalou C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. Eur J Endocrinol. 2005; 153:701-9.

46. Busnardo B, De Vido D. The epidemiology and etiology of differentiated thyroid carcinoma. Biomed Pharmacother. 2000; 54:322-6.

47. DeGroot LJ, Larsen PR, Hennemann G. The thyroid and its diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 1996.

48. Ponder BA. The phenotypes associated with *RET* mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. Cancer Res. 1999; 59:1736-42.

49. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, et al. Heterogeneous mutation of the *RET* protooncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. Cancer Res. 1996; 56:2167-70.

50. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffeenecker I, Zedenius J, Lips CJM, et al. International *RET* mutation consortium. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of international *RET* mutation consortium. J Intern Med. 1995; 238:343-6.

51. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutation of the *RET* protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2a. Nature 1993; 363: 458.

52. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novelhuman transforming gene, RET, by DNA rearrangement. Cell 1985; 42:581-8.

53. Barril N, Tajara EH. Aspectos moleculares do câncer tiroideano. Arq Bras Endocrinol Metab. 1999; 43:313-24.

54. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. Ann NY Acad Sci. 2002; 963:116-21.

55. Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, et al. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82:3741-7.

56. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, et al. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. Surgery. 1996; 120:944-7.

57. Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, et al. Upregulation of the angiogenic factors PlGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. Oncogene. 1997; 15:2687-98.

58. Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong GH, Becks GP & Hill DJ. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. J Endocrinol. 1998; 157:5-12.

59. Klein M, Picard E, Vignaud JM, Marie B, Bresler L, Toussaint, Weryha G, Duprez A & Leclere J. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. J Endocrinol. 1999; 161:41-9.

60. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. J Endocrinol. 2000; 166:475-80.

61. Stabenow E, Tavares MR, Ab´Saber AM, Parra-Cuentas ER, de Matos LL, Eher EM et al. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. Clinics. 2005; 60: 233-40.

62. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F, et al. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma, J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:656–8.

63. Klubo-Gwiezdzinska J, Junik R, Kopczynska E, Juraniec O, Kardymowicz H. The comparison of serum vascular endothelial growth factor levels between patients with metastatic and non-metastatic thyroid cancer, and patients with nontoxic multinodular goiter. Eur J Endocrinol. 2007; 157:521-7.

64. Kung SP, Lee CH, Yang AH, Chi CW, Tseng LM, Wu CW. Expression of c-Kit, Flk-1, and Flk-2 receptors in benign and malignant tumors of follicular epithelial origin. J Chin Med Assoc. 2006; 69:74-9.

65. Rodrigues A. Perspectivas de novos tratamentos para o carcinoma tireoidiano avançado. Rev Col Bras Cir. 2006; 33(3):189-97.

66. Braga-Basaria and Ringel M. Beyond Radioiodine: A review of potential new therapeutic approaches for thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(5):1947-60.

67. Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, Shuman M. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. J Urol. 1999; 161: 60-3.

68. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumour angiogenesis. Oncologist. 2000; 5: 3-10.

69. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist. 2004; 9:2-10.

70. Wildiers H, Guetens G, DeBoeck G, et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. Br J Cancer. 2003; 88:1979-86.

71. Ryan A, Wedge SR. ZD6474 inhibits VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity. British J Cancer. 2005; 92(Suppl 1):6-13.

72. Carlomagno F, Santoro M. Identification of RET kinase inhibitors as potential new treatment for sporadic and inherited thyroid cancer. J Chemother. 2004; 16:49-51.

73. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortura G, Vecchio G, et al. ZD6474, an orally available inhibitor of kdr tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic ret kinases. Cancer Res. 2002; 62 (24): 7384-90.

74. Castellone MD, Carlomagno F, Salvatore G, Santoro M. Receptor tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2008; 22(6): 1023–38.

75. Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2004; 61:299-310.

76. Santoro M, Fusco A. New drugs in thyroid cancer. Arq Bras Endocrinol Metab. 2007; 51(5):857-61.

Recebido: 10/02/2009

Aceito: 20/03/2009