

# Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais

ANDRESSA BERNARDI<sup>1</sup>  
MARIA CAROLINE JACQUES-SILVA<sup>2</sup>  
GUIDO LENZ<sup>3</sup>

1. Graduanda do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), bolsista de Iniciação Científica.
2. Farmacêutica-bioquímica e doutoranda em Ciências Biológicas – Bioquímica/ UFRGS.
3. Professor Adjunto do Departamento de Biofísica.  
Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Anexo, Laboratório 37, ICBS, UFRGS. 90035-003, Porto Alegre, RS. e-mail: andressabernardi@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

As principais características das células neoplásicas que as distinguem das células normais são a proliferação descontrolada, indiferenciação e perda da função, poder de invasão e de gerar metástases. Uma das principais dificuldades no uso da quimioterapia no câncer é que o tumor geralmente se encontra bem avançado por ocasião do diagnóstico (*Rang et al, 2001*). Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados, em particular os que são citotóxicos, afetam, em sua maioria, apenas uma das características das células cancerosas, o processo de divisão celular, sendo, portanto, apenas antiproliferativos. Esses fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, eles irão afetar todos os tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo então, em maior ou menor grau, os conhecidos efeitos colaterais de uma quimioterapia. Ressalta-se ainda que os próprios agentes antineoplásicos podem também, em certas circunstâncias, serem carcinogênicos.

Considerando a necessidade de novas abordagens para o tratamento do câncer, estudos bioquímicos dos mecanismos de transdução de sinal celular possibilitaram um melhor entendimento da biologia da célula neoplásica. Dessa forma, novos mecanismos de ação estão sendo explorados no desenvolvimento de novos medicamentos no combate ao câncer. O presente trabalho propõe-se a apresentar uma revisão da abordagem molecular no desenvolvimento desses novos fármacos.

## BIOLOGIA DAS CÉLULAS CANCEROSAS: ASPECTOS GERAIS

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo em estágios múltiplos, envolvendo geralmente mais de uma alteração genética e, também, muitos outros fatores que, ocorrendo ou não de forma simultânea, podem resultar numa neoplasia.

Importantes processos celulares, como crescimento, diferenciação, motilidade e apoptose (morte celular programada) são regulados por sinais provenientes de outras células e da matriz extracelular ou por fatores de crescimento e citocinas (*Dirks & Rutka, 1997*). As células podem se dividir em resposta a fatores de crescimento que atuam sobre RTKs (receptores de superfície tirosino-quinases), que, por sua vez, deflagram eventos intracelulares que resultam na produção dos transdutores do ciclo celular, que levam à síntese de DNA e, conseqüentemente, à divisão celular.

Um defeito em qualquer uma dessas etapas (por ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais) pode resultar em proliferação descontrolada, já que a progressão, através do ciclo celular, depende do equilíbrio entre várias forças regu-

ladoras positivas e negativas (*Karp & Broder, 1995*). As forças positivas envolvem fatores de crescimento, que estimulam a célula a entrar no ciclo, além de uma série de ciclinas e de quinases ciclina-dependentes (cdks).

As ciclinas se ligam às cdks, ativando-as, e essas promovem ativação de substratos que desencadearão a liberação de fatores de transcrição e conseqüente ativação de genes e síntese protéica. A ação das ciclinas/cdks é modulada pelas forças reguladoras negativas, que são proteínas que se ligam às cdks e inibem sua ação. Essas proteínas são induzidas por vários genes, como, por exemplo, o gene *p53* e o gene do retinoblastoma (*Rb*). Se houver algum tipo de lesão no DNA, esses genes funcionam como inibidores, que interrompem o ciclo celular nos pontos de controle que ele possui, permitindo, então, o reparo do DNA. Se o reparo falhar, inicia-se o processo de apoptose. Nas células cancerosas, pode ocorrer perda do controle do ciclo celular em conseqüência de:

- Anormalidade na função dos fatores de crescimento e/ou
- Função anormal da ciclina/cdk e/ou
- Síntese anormal de DNA em decorrência da atividade de oncogenes e/ou
- Diminuição anormal das forças reguladoras negativas, devido à ocorrência de mutações dos genes supressores tumorais.

## PRINCIPAIS ALVOS MOLECULARES E MECANISMOS DE AÇÃO DOS NOVOS MEDICAMENTOS

Diversas abordagens moleculares estão em fase de investigação. Há atualmente 209 novas drogas sendo investigadas, inclusive em Fase de estudo III. A maioria delas, baseadas nos progressos realizados no conhecimento da biologia da célula cancerosa, se refere ao uso de alvos seletivos para atuação dos agentes anti-tumorais. Subdividem-se em oito grandes grupos, de acordo com o mecanismo de ação proposto. Na seqüência e na tabela I têm-se esses grupos com alguns de seus representantes.

### ⇒ Drogas que visam alteração da expressão gênica / Terapia Gênica:

A utilização de oligonucleotídeos anti-sentido (ONs, “antisense oligonucleotides”) permite o bloqueio da expressão de um oncogene. Os ONs são pequenos segmentos sintéticos de DNA de filamento único, que são complementares a uma porção do mRNA e que podem ligar-se à sua seqüência correspondente no mRNA. A conseqüente porção de filamento duplo (um híbrido de mRNA e ON DNA) impede a tradução do mRNA e, assim, bloqueia a expressão do oncogene particular. ONs, que têm por alvos o gene *Bcl-2* (um tipo de gene antiapoptótico), têm sido objetos de estudos clínicos.

A tecnologia mais recente e promissora, em termos de supressão gênica, é o RNAi (RNA interference). RNA dupla fita são processados por enzimas intracelulares, produzindo fragmentos de 21 a 23 pares de base, com 19 bases pareadas. Estes pequenos fragmentos de RNA levam a degradação do RNA mensageiro que possui a seqüência correspondente às 19 bases. Este mecanismo é específico ao nível de apenas um nucleotídeo.

Desta forma, é possível bloquear a expressão de um oncogene que sofreu mutação, sem, contudo, atingir a expressão do proto-oncogene, como foi mostrado para o oncogene Ras (Brummelkamp et al., 2003), abrindo a possibilidade para um tratamento totalmente ausente de efeitos colaterais. É importante mencionar, no entanto, que este tipo de tratamento exigiria um conhecimento bastante específico das alterações genéticas de cada paciente acometido de câncer, mas a simplificação dos métodos de seqüenciamento está abrindo esta possibilidade para um futuro não muito distante.

Há, também, estudos clínicos (Fase III) em câncer de cabeça e pescoço, envolvendo a injeção, no tumor, de vetores adenovirais recombinantes contendo o gene *p53* humano, bem como estudos clínicos de glioblastomas (tumores cerebrais de elevada malignidade) envolvendo vetores de herpes-vírus para que esses transportem um gene para ativar uma pró-droga.

#### Abordagens promissoras da terapia gênica para o câncer

- restaurar mecanismos protetores como *p53*;
- inativar a expressão de oncogenes;
- fornecer um gene para células malignas, tornando-as sensíveis às drogas;
- fornecer um gene às células hospedeiras sadias para protegê-las da quimioterapia;
- marcar células cancerosas com genes para torná-las imunogênicas.

Tabela II: Terapia Gênica e Câncer / Fonte: Rang et al, 2001

#### ⇒ Inibidores da Transdução de Sinal:

Incluem-se, nesta categoria, os inibidores da ligação dos fatores de crescimento ao receptor. Quando fatores de crescimento, como por exemplo EGF (fator de crescimento epidermal), se ligam às proteínas de membrana chamadas de Her-2, essas se dimerizam e enviam ao núcleo sinais pró-mitóticos. Esse mecanismo ocorre em células normais, mas uma diferença das células normais para as células malignas é que, na superfície das células tumorais, a proteína está presente em quantidades tão grandes, que as moléculas, mesmo sem fatores de crescimento, se unem em dímeros, de modo que a mitose ocorre constantemente.

O ZD 1839 é uma nova molécula em estudo que tem por mecanismo de ação impedir que as células formem dímeros. Dessa forma, as células tumorais se dividem menos (Tzabar et al, 1998). Está sendo empregada, em casos de câncer de mama metastático (Fase Clínica III). Baseado nesse mesmo raciocínio, há outros inibidores de RTKs, sendo testados com a finalidade de interferir nos mecanismos de transdução de sinal envolvidos na proliferação celular (Nygren et al, 2003).

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença em que a principal característica das células é possuir uma translocação recíproca t(9;22) que gera um novo gene, fruto da fusão de dois genes: BCR-ABL no cromossomo derivado 22q- (cromossomo Philadelphia) e ABL-BCR no cromossomo 9q+. O produto do gene *abl* é uma proteína tirosina-quinase, que é capaz de se auto-ativar, quando dimerizada.

A proteína fusionada BCR-ABL leva a auto-ativação da ABL, que desregula as vias normais de transdução de sinal

intracelular, causando alteração no ciclo celular, inibição da apoptose e aumento da proliferação celular. Uma vez identificada a principal mutação responsável pela enfermidade, as pesquisas levaram ao desenvolvimento da droga mesilato de imatinib (STI 571), que atua diretamente na proteína mutada BCR-ABL e previne a fosforilação de substratos envolvidos na regulação do ciclo celular. O imatinib é agora considerado padrão ouro para o tratamento de paciente com LMC que não possuem um doador compatível de medula ou que não são candidatos a transplante (Peggs e Mackinnon, 2003).

A este grupo pertencem, também, os inibidores de Ras (proteína de ligação de guanina-nucleotídeos com atividade de GTPase) e vias por ela ativada. Esses inibidores bloqueiam a capacidade que tem os genes *ras* mutantes de se tornarem células malignas. Nas células normais, a proteína Ras, uma vez sintetizada, migra para a membrana celular, à qual se fixa por uma espécie de “gancho molecular” (um grupo farnesil). Este grupo é adicionado à proteína pela enzima farnesiltransferase. Recentemente, foram produzidos compostos que inibem esta enzima, como o RI 15777. Foi demonstrado, por testes *in vitro e in vivo* ( Fase Clínica III), que esse composto reverte a transformação maligna em células cancerosas que contêm o oncogene *ras*, restaurando os padrões normais de crescimento, sem interferir na divisão celular das células normais ( Nygren et al, 2003 ).

#### ⇒ Inibidores da invasão do tumor e metástases:

Recentemente, muita atenção tem sido direcionada à possibilidade de se impedir que a célula tumoral seja capaz de induzir degradação da matriz extracelular e invadir o estroma, ocasionando metástases. O uso de mecanismos de inibição de disseminação dessas células tem sido bem-sucedido. As enzimas chamadas metaloproteinases, que são uma família de endopeptidases, estão envolvidas, tanto na invasão, quanto nas metástases dos cânceres, por terem a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular. Agentes que inibem essas enzimas, como, por exemplo, o marimastat, já se encontram em estudos clínicos de Fase III.

#### ⇒ Inibidores de Angiogênese:

A angiogênese (crescimento de vasos sanguíneos para a irrigação do tumor) é necessária para nutrição e conseqüente progressão do tumor. Há vários reguladores endógenos (positivos e negativos) que controlam a angiogênese, como a angiogenina e o fator de crescimento endotelial vascular. Os inibidores da angiogênese atuam nesses reguladores endógenos, a fim de impedir a irrigação do tumor, mas os mecanismos exatos são ainda controversos. Inclui-se, nesta categoria, a talidomida, medicamento usado, no passado, para enjôos, durante a gravidez (uso abolido devido a teratogênese causada), mas que, por mostrar atividade antiangiogênica, tem sido usada em estudos clínicos, nos Estados Unidos e Europa, no tratamento de diferentes tipos de tumores, em combinação com outros agentes (Raje & Anderson, 2002).

#### ⇒ Agentes Diferenciadores:

Sabe-se que um dos processos que resultam na malignidade das células é a perda do processo de diferenciação. Estudos com o objetivo de induzir a diferenciação e tornar as células “normais” utilizam análogos da vitamina D<sub>3</sub> e agonistas do receptor do ácido retinóico, mas as vias pelas quais esses compostos induzem a diferenciação ainda não estão bem descritas.

#### ⇒ Inibidores Imunogênicos:

Anticorpos monoclonais (Mabs) são moléculas versáteis

com potencial terapêutico e aplicações em várias enfermidades humanas, incluindo o câncer (Carter et al, 2001). Estão sendo utilizados Mabs para fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas ou receptores que controlam o crescimento e outras funções da célula tumoral e, também, Mabs anti-idiotípicos como vacinas para gerar uma resposta imune. Ressalta-se que algumas vacinas geraram resultados negativos, mas que sua eficiência tem sido observada, principalmente quando administrada como adjuvante, observado em câncer colo-retal em estudo de Fase Clínica III (Nygren et al, 2003).

#### ⇒ **Reversores de resistência induzida por drogas:**

Desde o surgimento do emprego da quimioterapia para o câncer (1940), foram identificados muitos de caminhos pelos quais as células cancerosas “escapam” do agente químico. No momento em que as células desenvolvem resistência a uma droga, elas podem também desenvolver resistência cruzada a outras drogas, química e mecanicamente não relacionadas, em um fenômeno conhecido como resistência multi-droga (MDR).

Muitas formas de MDR resultam da expressão de bombas de fluxo ATP-dependente com ação sobre diferentes substratos (Nygren et al, 2003). Muitos estudos mostram o envolvimento da PgP, uma P-glicoproteína, nessa resistência. A estratégia é a utilização de drogas que inibem essa proteína transportadora, como verapamil e ciclosporina A.

#### ⇒ **Novas drogas citotóxicas e indutores de apoptose:**

Muitas drogas citotóxicas exercem seu efeito por indução de apoptose, porém muitas células adquirem resistência a essas drogas por modificações em elementos chaves da sinalização apoptótica.

**Tabela I:** Tabela Geral com alguns representantes de cada grupo dos novos fármacos anti-tumorais.

CLASSIFICAÇÃO	FÁRMACO	MECAÇÃO OU SUBGRUPO	FASE CLÍNICA
Modificadores da expressão gênica	Decitabina	Interação com DNA/histonas e inibição da DNAmetiltransferase	III
	SCH 58500	Vetor adenoviral que codifica p53	I
	ZD 1839	Inibição de RTKs para EGF/Her	III
Inibidores da transdução de sinal	RI 15777	Inibição de RAS farnesiltransferase	III
	Avastin®	Inibição de BCR-Abl	Em uso
	Marimastat	Inibição das metaloproteinases (MMP)	III
Inibidores da invasão do tumor e metástases	Talidomida	Mecanismo desconhecido	III
	Interleucina-12	Mecanismo desconhecido	I
	ILX 23-7533	Análogo da vitamina D	III
Agentes diferenciadores	9-cis-acido-retinóico	Agonista de RA-R (receptor do ácido retinóico)	II
	FD 54D7	Mabs anti-idiotípico	I
	IL-2/ kistavirine	Estimulação da atividade das células NK	III
Reversores da resistência a drogas	Ciclosporina-A	Inibição da P-glicoproteína ( PgP)	III
	Verapamil	Inibição da P-glicoproteína ( PgP)	III

A conjugação de drogas citotóxicas a anticorpos (imunocombinados) é uma alternativa muito promissora na terapia do câncer. Outra alternativa é o acoplamento de um anticorpo a uma enzima capaz de converter uma droga não-tóxica em um metabólito de elevada toxicidade. Os anticorpos são direcionados a antígenos específicos do tumor, de modo que a droga é conduzida e concentra-se, no tumor, não afetando os tecidos normais das proximidades.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a terapia atual para o câncer dependa principalmente do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação da célula normal e cancerosa proporcionaram a descoberta de novos alvos possíveis para o tratamento do câncer. É improvável que novas terapias venham a substituir totalmente as drogas existentes, uma vez que estas drogas tornaram-se mais eficazes e suas toxicidades, mais tratáveis e previsíveis, nos últimos anos. No entanto, uma combinação de drogas existentes, novas abordagens e a obtenção de um perfil molecular/genético de cada tumor faria com que todo o paciente tivesse um tratamento individualizado e específico para o seu caso, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUOLAMWINI, K. J. Novel anticancer drug discovery. *Curr. Op. Chem. Biol.* v. 3, p. 500-509, 1999.
2. BRUMMELKAMP, T.R., BERNARDS, R., AGAMI, R., Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2, 243-247, 2003.
3. CARTER, P., Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Rev. Cancer*, v. 20, p. 118-129, 2001.
4. DIRKS, P. B. e RUTKA, J. T. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle- a review. *Neurosurgery*, v. 40, p 1000-1013, 1997.
5. DRUKER, J. B. and LYDON, B. N. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Inv.* v.205, n° 1, january 2000.
6. ELZAYFD, A. Y., SAUSVILLE, A. E., Selected Novel Anticancer Treatments Targeting Cell Signaling Proteins. *Oncologist*, v. 6, p. 517-537, 2001.
7. GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996.
8. KARP, J. E., BRODER, S., Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nature*, v.1, p. 309-319, 1995.
9. NYGREN, P. & LARSSON, R., Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs. *J. Int. Medic.* v.253, p. 46-75, 2003.
10. PEGGS, G. e MACKINNON, S. Imatinib mesylate – the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *J. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 1048-1050, 2003.
11. RAJE, N. e ANDERSON, K. C. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* v. 14, p. 635-640, 2002.
12. RANG, H. P. e DALE, M. M., *Farmacologia*, Guanabara Koogan, 4ed., 2001.
13. SHONO, T.; TOFILON, J.; BRUNER, M.; OWOLABI, O.; LANG, F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* v. 61, p. 4375-4381, 2001.
14. TZAHAR, E., YARDEN, Y., The Erb/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta*, 1377: M25-M37, 1998.