

Hipóxia e câncer de mama: uma possibilidade futura como terapia-alvo

Hypoxia and breast cancer: a future possibility as targeted therapy

Luiz Gustavo Oliveira Brito¹, Viviane Fernandes Schiavon¹, Heitor Ricardo Cosiski Marana²

Descritores

Neoplasias da mama
Hipoxia celular
Prognóstico

Keywords

Breast neoplasms
Cell hypoxia
Prognostic

RESUMO

Objetivo: Os autores discutem o papel da hipóxia como causa e consequência da carcinogênese mamária e detalham a função de uma proteína, o fator induzível por hipóxia tipo 1 alfa (HIF-1 α), como marcador prognóstico e o início de estudos em terapia-alvo com a utilização de inibidores. **Métodos:** Revisão bibliográfica da literatura. **Resultados e Conclusão:** A HIF-1 α é um importante fator de mau prognóstico tanto em tumores iniciais quanto em localmente avançados e se encontra associado a diversas variáveis, como status axilar e positividade para a proteína Her-2. Contudo, ainda não existem trabalhos suficientes comprovando sua eficácia como fator preditivo.

ABSTRACT

Objective: The authors discuss the role of hypoxia as cause and consequence of breast carcinogenesis and emphasize a protein's function, hypoxia inducible factor type 1 alpha (HIF-1 α), as a prognostic marker and initial studies in target therapy regarding the utilization of HIF-1 α inhibitors. **Methods:** Bibliographic review of the literature. **Results and Conclusion:** HIF-1 α is an important worse prognostic factor in initial and locally advanced tumors and that it is associated with diverse variables, such as axillary status and Her-2 positivity. However, there are fewer researches analyzing its efficacy as a predictive factor.

Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹ Título de Especialista em Ginecologia e Obstetrícia (TEGO); Título de Especialista em Mastologia (TEMa); Mestre pela FMRP-USP; Médico assistente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da FMRP-USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

² Título de Especialista em Ginecologia e Obstetrícia (TEGO). Título de Especialista em Mastologia (TEMa). Doutor pela FMRP-USP; Médico colaborador do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da FMRP-USP. Docente da Universidade de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Luiz Gustavo Oliveira Brito – Rua Triunfo, 199/12 – Santa Cruz – CEP 14020-670 – Ribeirão Preto (SP), Brasil – E-mail: lbrito@usp.br

Recebido em: 27/09/2010. **Aceito em:** 12/07/2011

Considerações gerais

O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres ocidentais. Estatísticas indicam aumento de frequência da neoplasia tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, estimou-se 192.370 mulheres com esta patologia para 2009, com 40.170 mortes¹. No Brasil, o tumor de mama é a principal causa de morte (15,6%) entre as mulheres, contabilizando mais de 9 mil óbitos por ano, segundo dados de 2008². Este também é o segundo tipo mais incidente de câncer, contabilizando 49,4 mil casos, sendo ultrapassado apenas pelos tumores de pele não melanoma. Apenas no estado de São Paulo, a estimativa para 2010 estipula aproximadamente 65 casos novos para cada 100 mil mulheres, perfazendo total de 27.620 pacientes².

Devido ao alto percentual de estádios clínicos avançados em nosso país, o tratamento cirúrgico não é a forma inicialmente mais recomendada nesses casos; aplica-se, nessa situação, a terapia neoadjuvante, cujo objetivo é reduzir o volume primário, proporcionando operabilidade nos casos inoperáveis e aumentando as taxas de cirurgia conservadora da mama nos casos passíveis de cirurgia. Embora não existam evidências de que a quimioterapia aplicada antes do tratamento cirúrgico leve a um ganho de sobrevida substancial, em comparação a aplicação após o tratamento cirúrgico, está estabelecido que pacientes que apresentam resposta objetiva com tratamento neoadjuvante, em especial resposta patológica completa, têm sobrevida livre de doença e global maior que os casos nos quais a resposta ao tratamento não foi satisfatória³.

Detectar, por meio de estudos biológicos, quais pacientes apresentarão resposta objetiva a um determinado tratamento relaciona-se à necessidade de conhecimento de mecanismos que propiciam o crescimento tumoral para responder essas questões, além de descobrir alvos para novas terapias. Diversos pontos do processo carcinogênico são revisitados, a depender do foco da pesquisa: neoangiogênese tumoral, mecanismos pró-inflamatórios, hipóxia, remodelação tissular e desdiferenciação celular, intra e extravasão celular e fenômenos epigenéticos e genéticos.

Assim como outros tumores sólidos, os tumores de mama necessitam de um microambiente que promova angiogênese, que não apenas mantém a viabilidade tumoral e seu crescimento, mas também contribui com a disseminação da doença. Esse mecanismo apresenta estreita relação com o prognóstico da doença e tem sido estudada há pelo menos 40 anos⁴.

Hipóxia e câncer

Um modelo não menos importante que promove a angiogênese é o mecanismo de hipóxia tecidual. A hipóxia está presente em muitos tumores sólidos, causada geralmente pela vasculari-

zação anormal neoplásica e pela rápida produção celular. Isso resulta em áreas de necrose tissular e rápida morte de células sadias⁵.

Define-se hipóxia como um nível de oxigenação menor que 1,5%, valor bem inferior que a média de 7% encontrada em tecidos bem vascularizados⁶. Tais medidas geralmente são tomadas com eletrodos que avaliam a tensão de oxigênio local, método considerado padrão-ouro para tal verificação. Sua desvantagem é não conseguir identificar as células que se desdiferenciam no ambiente hipóxico⁷.

Marcadores bioquímicos produzidos em ambiente hipóxico estão relacionados a diversos cânceres, notadamente o de mama, e têm sido considerados fatores prognósticos para tumores altamente indiferenciados, com recentes pesquisas sobre a sua aplicabilidade clínica como terapia-alvo^{8,9}. Não se sabe se a hipóxia contribui para a formação de tumores agressivos ou se estes têm um padrão de hipóxia difusa (o mecanismo central é o desvio angiogênico, com produção de fatores neovasculares potentes, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo que uma explicação não exclui a outra. Porém, ela tem sido utilizada como parâmetro prognóstico em diversos estudos.

Se a hipóxia é severa ou prolongada, a morte celular ocorre. As células tumorais podem sofrer mudanças genéticas e adaptativas que as permitem escapar de perecer da deprivação de oxigênio. Tais alterações são associadas a um fenótipo mais agressivo, e à maior resistência à radio e quimioterapia¹⁰.

Fator induzível por hipóxia

A ampla resposta celular desencadeada pela hipóxia é mediada pelo HIF-1 (fator induzível por hipóxia). Ele é uma proteína heterodímera (fator de transcrição nuclear) dividida em duas subunidades, a alfa (α) e a beta (β), ambas membros de uma família de proteínas (bHLH). A subunidade α apresenta três tipos de unidades (1α , 2α , 3α), sendo a 1α superexpressa em tumores mamários e a que apresenta importância funcional e, provavelmente, prognóstica¹¹.

Em condições de normóxia, são reconhecidas pela proteína de von Hippel Lindau (pVHL) e degradadas por hidroxilação por meio dos domínios da prolina hidroxilase (PHD's) e do fator inibidor da hipóxia (FIH-1) e, por fim, sofrem ubiquitinação via proteassomo¹¹.

Contudo, no período de hipóxia, como não há a presença das PHD's e do FIH-1, o HIF-1 migra do citoplasma para o núcleo, e por conta da sua ligação com os elementos de resposta à hipóxia (HRE) na sequência 5'-RCGTG-3' (onde R é qualquer base purínica), assim como do fator de transcrição CBP300, e é levado à produção de genes-alvo¹¹. Em especial, há aumento na ativação dos genes que controlam o transporte de glicose, a glicólise, gliconeogênese, produção de fatores de

crescimento, metabolismo de fosfatos de alta energia, eritropoiese, metabolismo do heme, transporte de ferro e síntese do óxido nítrico. Isto posto, aumenta a chance de sobrevivência da célula cancerígena sobre condições de hipóxia.

A principal fonte de estímulo do HIF-1 α é a hipóxia; porém ele também pode ser estimulado pela mutação do proto-oncogene PTEN¹², p53¹³ e pela superexpressão do oncogene Her-2/neu¹⁴. Em estudo realizado por Garieri¹⁵ no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), foram observados maiores níveis séricos de HIF-1 α em pacientes Her-2 positivo do que no grupo Her-2 negativo, tendo sido considerado fator preditivo importante, com pior sobrevida global e menor intervalo livre de doença para este subgrupo.

O papel do HIF-1 na carcinogênese mamária deve-se ao fato dele induzir à transcrição do VEGF (fator de crescimento epidermóide vascular), levando a uma maior angiogênese tumoral^{16,17}; daí a utilização de anticorpos monoclonais (bevacizumab) contra o VEGF, apresentando ótimos resultados no controle tumoral, tanto em estudos pré-clínicos quanto em pacientes com doença metastática¹⁸.

O HIF-1 α também pode ser superativado como consequência de fatores de crescimento vascular, tais como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento epidérmico), FGF-2 (fator de crescimento derivado dos fibroblastos), TGF-1 β (fator de crescimento transformador) e IGF (fator de crescimento derivado da insulina), e citocinas, incluindo TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 β . Tal mediação ocorre por meio de duas importantes vias de sinalização, a RAS/MEK/MAPK e, em especial, a cascata PI3K/Akt/mTOR¹¹.

Outro aspecto crucial é se existe diferença ou mudança na ativação dos genes-alvo que normalmente o HIF-1 α realizaria, seja de uma maneira mais ou menos intensa. Sabe-se que a anidrase carbônica (CAIX), um membro da família das metaloenzimas ligadas ao zinco, é alvo amplamente ativado pelo HIF-1 α . Sua função é regular o pH intra e extracelular pela conversão de dióxido de carbono em ácido carbônico. Tal marcador tem se mostrado de valor prognóstico em vários tumores (mama, cervical, nasofaríngeos). Outra proteína de membrana amplamente ativada é o transportador de glicose 1 (GLUT-1), frequentemente superexpresso em tumores, cuja função é aumentar a captação de glicose pelas células tumorais¹⁰.

HIF-1 α e câncer de mama

Investigações enfocando o valor prognóstico do HIF-1 α no câncer de mama têm surgido. O estudo de Schindl et al.¹⁹ evidenciou que a superexpressão de HIF-1 α esteve associada à pior sobrevida global em pacientes com câncer de mama local-

mente avançado; Bos et al.²⁰, entretanto, já encontraram esta associação em pacientes axila negativa, inclusive. Em um estudo com espécimes tissulares da mama de pacientes com doença pré-neoplásica e com carcinoma mamário foi observada correlação positiva entre o HIF-1- α e tumores menos diferenciados e de maior risco neoplásico²¹.

Em trabalho realizado no DGO-FMRP-USP, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de HIF-1 α e VEGF antes e após quimioterapia adjuvante¹⁵. Porém, não existem estudos mostrando se há redução ou não da marcação imunohistoquímica do HIF-1 α após tratamento neoadjuvante; poucas pesquisas ainda estão disponíveis na literatura, correlacionando o HIF-1 α a fatores prognósticos classicamente conhecidos, como o estado axilar, status hormonal e outros marcadores imunohistoquímicos.

Uma associação importante é encontrada entre o status axilar positivo e a marcação forte e difusa de HIF-1 α em pacientes com tumores localmente avançados. Em trabalho executado por Gruber et al.²², que contou com casuística de 77 pacientes o HIF-1 α era expresso na maioria dos casos com axila positiva, servindo como fator de mau prognóstico neste grupo, especificamente no subgrupo com tumores T1/T2; na casuística dos mesmos, nenhuma variável permaneceu na análise multivariada associada ao HIF-1 α . Outro trabalho com resultados similares foi o executado por Schindl et al.¹⁹, envolvendo somente pacientes com axila positiva, quase todas com tumores T1 ou T2 (192/206 pacientes), e a expressão de HIF-1 α foi altamente significativa.

Contrariamente ao exposto acima, Bos et al.²⁰ realizaram uma pesquisa com 81 mulheres axila negativa e 69 pacientes com axila positiva tratadas e concluíram que altos níveis de HIF-1 α tiveram profundo impacto na sobrevida global e no intervalo livre de doença no subgrupo de pacientes com tumores axila negativa, sem influência nos casos de axila acometida. O detalhe é que nenhuma paciente recebeu tratamento quimioterápico pré-operatório porque todos os tumores localmente avançados foram excluídos desta pesquisa. Provavelmente houve influência da quimioterapia em trabalhos envolvendo pacientes com estádios mais avançados.

Quanto à expressão do antígeno c-erbB2 em pacientes com HIF-1 α , sabe-se que existem associações bem documentadas em câncer de mama. Uma publicação de Giatromanolaki et al.²³ mostrou que pacientes com tumores apresentando alta expressão de HIF-1 α e amplificação do gene HER-2 tiveram pior sobrevida global. Em nossa casuística, tal correlação não foi observada.

Existem pouquíssimos trabalhos estudando o valor preditivo do HIF-1 α em relação a terapêuticas neoadjuvantes, com tendência ao aumento na busca por tais informações, visando o desenvolvimento de terapias-alvo. Em um trabalho experimental conduzido por Narita et al.²⁴, o uso do KC7F2, um inibidor

da via do HIF-1 α , preveniu a ativação de genes da anidrase carbônica, MMP2 (matrix metaloproteinase), endotelina 1 e enolase 1, assim como de mecanismos relacionados à síntese protéica de HIF-1 α , funcionando de forma eficaz.

Conclusão

Em suma, existe ligação entre a expressão de marcadores relacionados à hipóxia e piores desfechos, o que reforça a necessidade de conhecer melhor o papel preditivo desta via, de investigar drogas inibidoras deste eixo e de seus produtos gênicos, identificar subpopulações de pacientes que venham a se beneficiar desta terapia, provavelmente daquelas que não respondem à terapia dita convencional, e aprender com o processo comum de carcinogênese, considerando-o de importante papel para a elucidação do tratamento do câncer de mama.

Referências

1. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology – Breast Cancer Version 01.2011. 148p.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. 98p.
3. Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM, Mejia JA, Hatzis C, Gonzalez-Angulo AM, et al. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol.* 2008;19(12):2020-5.
4. Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg.* 2007;42(1):1-11.
5. Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol.* 2001;28:29-35.
6. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 2004;9(5):10-7.
7. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):993-8.
8. Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):38-47.
9. O'Donnell JL, Joyce MR, Shannon AM, Harmey J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1-alpha (HIF-1alpha) expression. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(6):407-16.
10. Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, et al. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1alpha expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol.* 2005;58(2):172-7.
11. Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(24):3233-47.
12. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000;14(4):391-6.
13. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 2000;14(1):34-44.
14. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. Her2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21(12):3995-4004.
15. Garieri AP. Produção de VEGF e HIF-1 alfa em paciente com carcinoma de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina. [Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP]. 2008. 49p.
16. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2002;161(3):947-56.
17. Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology.* 2005;46(1):31-6.
18. Rosen LS. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist.* 2005;10(6):382-91.
19. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwansy W, Gnant M, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(6):1831-7.
20. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003;97(6):1573-81.
21. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):309-14.
22. Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebbersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):R191-8.
23. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, et al. c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1alpha dependent. *Clin Cancer Res.* 2004;10(23):7972-7.
24. Narita T, Yin S, Gelin CF, Moreno CS, Yepes M, Nicolaou KC, et al. Identification of a novel small molecule HIF-1alpha translation inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6128-36.