

Atualização

Mecanismos de diferenciação neuroendócrina no carcinoma brônquico de pequenas células.

Mechanisms of neuroendocrine differentiation in small cell lung cancer.

Bruno Wendhausen de Oliveira¹, Cyro Teixeira da Silva Junior²,
Gilberto Perez Cardoso³, Elizabeth Giestal de Araujo⁴.

RESUMO

Neoplasias malignas do pulmão são classificadas em dois principais grupos histológicos: carcinomas de pequenas células (SCLC) e carcinomas de não pequenas células (NSCLC). Entre estes, alguns carcinomas são subdivididos em tumores neuroendócrinos do pulmão. Segundo a OMS, os tumores neuroendócrinos do pulmão incluem: os carcinóides típicos e atípicos, carcinomas neuroendócrinos de grandes células e os SCLC. Células neuroendócrinas são diferenciadas para produzir, estocar e liberar grandes quantidades de peptídeos secretórios. Diversos membros dos fatores de transcrição hélice-alça-hélice básicos ((bHLH) são importantes reguladores da expressão gênica de neuropeptídeos em células diferenciadas. Mash 1, em roedores, ou seu homólogo no homem hASH1, é um importante fator de transcrição bHLH no desenvolvimento precoce de células neurais e neuroendócrinas em tecidos diversos, incluindo o pulmão. O significado dos fatores bHLH foi revisado, neste trabalho, em SCLC e em células pulmonares neuroendócrinas (PNECs). PNECs são positivas para Mash 1 na imunohistoquímica. Não PNECs são positivas para Hes1, um repressor de bHLHs. PNECs e hASH1 estão *upregulated* em tecidos pulmonares neoplásicos e não neoplásicos. Estudos de SCLC sugerem que a diferenciação neuroendócrina pode ser regulada por hASH1.

Descritores: câncer de pulmão; fator hélice-alça-hélice; células pulmonares neuroendócrinas; diferenciação neuroendócrina.

ABSTRACT

Lung cancers are classified into two main histological groups: small cell carcinomas (SCLC) and non-small cell carcinomas (NSCLC). Among these, some carcinomas are subdivided into neuroendocrine (NE) lung tumours. According WHO NE lung tumours include typical carcinoids, atypical carcinoids, large cell neuroendocrine carcinomas (LCNEC) and SCLC. All of which show histological features of NE morphology. Neuroendocrine cells are specialized to produce, maintain and release large stores of secretory peptides. A fundamental question in the development and regulation of neuroendocrine systems is the control of cellular secretory capacity. Achaete-scute homolog-1 (termed Mash1 in rodents, hASH1 in humans) is a basic helix-loop-helix transcription factor important in early development of neural and neuroendocrine (NE) progenitor cells in multiple tissues, including the lung. Several members of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors are important regulators of neuropeptide gene expression in differentiating cells. We review the significance of a network of basic helix-loop-helix (bHLH) factors in SCLC and pulmonary neuroendocrine cells (PNECs). Immunohistochemically, PNECs are positive for Mash1 and non-PNECs are positive for Hes1, one of the repressor bHLHs. PNECs and hASH1 are upregulated in diseased lung tissues (neoplastic and nonneoplastic). Studies of small cell carcinoma suggest that neuroendocrine differentiation could be regulated by hASH1.

Keywords: Lung cancer; basic helix-loop-helix; pulmonary neuroendocrine cells; neuroendocrine differentiation.

1. Graduando da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense

2. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense. Disciplina de Pneumologia.

3. Professor Titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense.

4. Professora Adjunta do Departamento de Neurobiologia da Universidade Federal Fluminense.

Trabalho realizado em conjunto pelos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médicas e Neuroimunologia da Universidade Federal Fluminense, Cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro. Não existe conflito de interesse por parte dos autores e instituição onde foi realizado o trabalho.

Endereço para correspondência: Cyro Teixeira da Silva Junior. Rua da Conceição, 13/210, Centro, CEP: 24020 080, Niterói, RJ, e-mail: ctsilvajunior@predialnet.com.br.

Recebido em 14/12/2007 e aceito em 19/02/2008, após revisão.

INTRODUÇÃO

O carcinoma brônquico é o que se manifesta com maior frequência nos indivíduos e tem sido demonstrado um aumento anual de 2% em sua incidência mundial. Infelizmente, até o presente momento, sua letalidade mantém-se elevada. No Brasil, é a principal causa de morte oncológica, entre os homens, e a segunda principal, entre as mulheres.¹ Nos Estados Unidos, é a principal causa de morte por câncer, tanto em homens quanto em mulheres.²

Os carcinomas brônquicos podem ser classificados em dois grandes grupos com diferentes comportamentos biológicos e prognósticos: carcinoma de pequenas células (SCLC), com características neuroendócrinas predominantes, e carcinoma de não pequenas células (NSCLC).¹

Dentre os tipos de SCLC, destaca-se o carcinoma indiferenciado de pequenas células, com três subtipos celulares: o linfocitóide (oat cell), o intermediário e o combinado (de células pequenas mais carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma).¹

Cerca de 75% dos SCLC têm fenótipo neuroendócrino, assim definido por expressar dois ou mais marcadores evidenciados pela técnica de imuno-histoquímica. A prevalência desta diferenciação neuroendócrina é variável na literatura e depende do critério imuno-histoquímico utilizado.^{3,4}

Diferenciação celular significa especialização celular. O primeiro tipo celular que manifesta diferenciação fenotípica, e pode ser morfológicamente definida, é a célula neuroendócrina, tanto em humanos quanto em animais.^{5,6} O fenótipo neuroendócrino define um grupo específico de células que possuem grânulos secretórios em seu citoplasma. Essas vesículas associam-se a uma variedade de produtos de secreção, antígenos de superfície celular e enzimas. Essa população de células contém, tanto os fenótipos endócrinos quanto neurônio específico.⁶

O fenótipo neuroendócrino está muito associado à produção de neuropeptídeos, que podem estimular a transformação e o crescimento tumoral através de sinalizações, tanto autócrinas quanto parácrinas.^{3,6}

As células pulmonares neuroendócrinas (NEPCs) também são chamadas de células de KULCHITSKY (Nicholas Kulchitsky, 1856 – 1925). Podem existir, tanto como células isoladas quanto em grupos de células, os quais são chamados, quando estão sob inervação, de corpos neuroepiteliais.⁷

NEPCs compartilham com as células neurais e as células neuroendócrinas padrões similares de expressão protéica. Esse padrão similar parece estar associado com as especializações de superfície celular, sistemas de transdução e seus sinais, componentes citoplasmáticos, vias secretórias, citoesqueleto e fatores de transcrição.⁶

As NEPCs estão presentes nos brônquios normais e no epitélio respiratório bronquiolar, junto à membrana basal da mucosa, nos homens e nos animais.

Os tumores neuroendócrinos do pulmão derivam do sistema celular neuroendócrino, que está amplamente distribuído pelo corpo. São um raro e heterogêneo grupo de neoplasias, caracterizado por diferenças embriológicas, biológicas e histopatológicas.⁸

Embora a origem das células neuroendócrinas pulmonares não tenha sido completamente determinada, a hipótese endodérmica é geralmente aceita, visto que NEPCs já foram obtidos em epitélios fetais (imaturos) *in vitro*.^{9,10} Além disso, carcinomas neuroendócrinos, como, por exemplo, o carcinoma de pequenas células, parece ser derivado de um epitélio normal.¹¹

A biologia do SCLC é complexa. A ativação de numerosos proto-oncogenes dominantes e a inativação de genes de supressão tumoral é descrita na literatura. Os proto-oncogenes dominantes, incluindo a família *myc*, *c-myc*, *c-kit*, *c-jun* e *c-scr*, foram associados à amplificação e expressão dos SCLC. A alteração na expressão de dois genes supressores do SCLC, *p53* e produtos do gene *retinoblastoma* já foi demonstrada.³

As células que fazem parte do “sistema neuroendócrino difuso” possuem características endócrinas de determinadas células e dos neurônios. Esse sistema inclui as células neuroendócrinas das ilhotas pancreáticas, gastrointestinal, respiratório, células C tireoidianas, células da medula adrenal e células pituitárias. Tais células parecem requerer fatores de transcrição semelhantes, para a expressão de proteínas neuroendócrinas comuns durante o processo de diferenciação.¹¹

DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA PULMONAR PELOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO bHLH

Transcrição é o mecanismo pelo qual as células copiam o DNA em RNA. Promotor é o sítio no DNA onde se liga a RNA-polimerase, a enzima responsável pela transcrição do gene (segmento de seqüência nucleotídica do DNA). Enquanto a RNA-polimerase bacteriana é capaz de iniciar a transcrição sem o auxílio de proteínas bacterianas adicionais, as RNA-polimerases eucarióticas não podem. Elas necessitam da ajuda de um grande número de proteínas denominadas fatores de transcrição.¹²

Fatores de transcrição são proteínas que se ligam em regiões definidas do DNA (promotoras) necessárias para a expressão gênica. Existem fatores de transcrição gerais e específicos. Os fatores de transcrição específicos são responsáveis pela expressão de proteínas célula-específicas e atuam como ativadores, co-ativadores, repressores e co-repressores.¹²

Grande número de fatores de transcrição estão envolvidos no processo de diferenciação celular. Destes, pode ser citados: *Pit1-Oct2-Unc86 (POU)*, hélice-alfa-hélice (*basic helix-loop-helix* ou *bHLH*), dedo de zinco (*zinc finger*) e homeodomínio (*homeodomains*) como fatores (supostamente) envolvidos no processo de diferenciação celular.¹³

Genes bHLH controlam a diferenciação celular em diversos tecidos e são categorizados em dois diferentes grupos definidos, geneticamente, como bHLH ativador e bHLH repressor.^{14,15}

Em mamíferos, genes bHLH, como por exemplo o gene *Mash-1* (*mammalian achaete-scute complex homolog-1*) e *Math-1* (*mammalian atonal homolog-1*), são expressos em células neurais precursoras, e eles fazem uma regulação positiva na expressão tardia dos genes bHLH.¹⁵

O MASH 1 é um fator essencial na diferenciação neuroendócrina do epitélio pulmonar e a proteína HES 1 é um dos fatores de inibição da diferenciação neuroendócrina.¹⁶⁻¹⁹

Homólogos humanos de Mash 1 (hASH 1) tem sido implicados na expressão de algumas neoplasias neuroendócrinas, incluindo o carcinoma de pequenas células do pulmão, neuroblastoma, feocromocitoma, carcinoma medular de tireóide e tumores neuroectodérmicos primitivos cerebral.²⁰⁻²³

O hASH 1 é crucial para a diferenciação neuroendócrina. Em linhagens de células oriundas de carcinoma pulmonar humano, RNAm de hASH1 é expresso, exclusivamente, nas linhagens de carcinoma de pequenas células. Esses estudos sugerem que a diferenciação celular, nos carcinomas pulmonares de humanos, é determinada pela ação de fatores de transcrição bHLH, assim como nas células epiteliais do pulmão fetal.^{20,23-25}

DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA NO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS

A classificação dos tumores neuroendócrinos pulmonares inclui os seguintes tipos: tumorlet, carcinóide típico e atípico, carcinoma neuroendócrino de grandes células e carcinoma de pequenas células.²⁶ Apesar desses tumores possuírem diferenciação neuroendócrina, apresentam diferentes propriedades morfológicas e biológicas.

A diferenciação neuroendócrina em carcinoma de pequenas células parece ser regulada pelo balanço dos fatores de transcrição bHLH e seus moduladores. Assim como no estudo de diferenciação neuroendócrina pulmonar de fetos de ratos, tem sido descrita a

presença do hASH 1 em algumas neoplasias neuroendócrinas em humanos, incluindo carcinoma pulmonar de pequenas células, neuroblastoma, carcinoma medular da tireóide e tumor primitivo neuroectodérmico cerebral.^{17,20-24,27-30}

Em linhagens de células de carcinoma pulmonar de humanos, RNAm hASH 1 é expresso, exclusivamente, em linhagens de carcinoma de pequenas células, não sendo identificado nas linhagens de células dos carcinomas de não pequenas células.^{13,20-24}

O fator de transcrição *Scratch*, um membro da família Zinc Finger, foi apontado, recentemente, na regulação da diferenciação neuroendócrina dos carcinomas pulmonares neuroendócrinos,³¹ porém parece não ter função alguma junto aos fatores proneural bHLH na diferenciação neuronal e não ter nenhum envolvimento no fenótipo invasivo do carcinoma de pequenas células.²⁷

HES 1 é considerado como sendo o repressor da diferenciação neuroendócrina no epitélio pulmonar de ratos,²⁵ sendo variavelmente expresso em carcinomas pulmonares de humanos. De acordo com análises de Western blot de Chen et al,¹⁷ linhagens de células positivas para hASH 1 para carcinoma pulmonar em humanos, muitos dos quais são carcinoma de pequenas células, possuem apenas traços da proteína HES 1. Em contrapartida, linhagens de células hASH 1 negativo, que são derivados de carcinoma de não pequenas células, expressam proteína HES 1.¹⁷

Após revisão dos trabalhos originais de pesquisa sobre o tema, os autores concluíram que os mecanismos regulatórios de diferenciação das células epiteliais pulmonares têm sido extensivamente estudados, nos últimos anos, e estes têm mostrado que o estabelecimento do fenótipo celular necessita da presença de fatores de transcrição, que ativariam ou reprimiriam a expressão de genes específicos. Apesar do relativamente simples mecanismo de diferenciação neuroendócrina no sistema epitelial pulmonar em fetos de ratos, o mecanismo sublinhado na determinação da diferenciação celular no câncer de pulmão em humanos parece ser mais complexo, porque carcinomas pulmonares têm numerosas mutações genéticas, e as características histológicas dos tumores variam extremamente, dependendo do caso.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Cancer. Ministério da Saúde do Brasil. [cited in 2007]. Available at: <http://www.inca.gov>
2. Sattler M, Salgia R. Molecular and cellular biology of small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2003;30:57-71.
3. Cook RM, Miller YE, Bunn PA Jr. Small cell lung cancer: etiology, biology, clinical features, staging, and treatment. *Curr Probl Cancer* 1993;17(2):69-141.
4. Slodkowska J, Zych J, Szturmowicz M, Demkow U, Rowinska-Zakrzewska E, Roszkowski-Sliz K. Neuroendocrine phenotype of non-small cell lung carcinoma: immunohistological evaluation and biochemical study. *Int J Biol Markers* 2005;20(4):217-26.
5. Wang XY. Achaete-scute homolog-1 linked to remodeling and preneoplasia of pulmonary epithelium. *Lab Invest* 2007;87(6):527-39.
6. Ito T. Differentiation and proliferation of pulmonary neuroendocrine cells. *Prog Histochem Cytochem* 1999;34:245-324.
7. Adriaensen D, Brouns I, Pintelon I, De Proost I, Timmermans JP. Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. *J Appl Physiol* 2006;101(3):960-70.
8. Franklin WA. Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and biochemical study. *Int J Biol Markers* 2005;20(4):217-26.
9. Emura M, Ochiai A, Gobert-Bohlen A, Panning B, Dungworth DL. Neuroendocrine phenotype differentiation in a hamster lung epithelial cell line under low oxygen pressure or after transformation by diethylnitrosamine. *Toxicol Lett* 1994;72:59-64.

10. Ito T, Nogawa H, Udaka N, Kitamura H, Kanisawa M. Development of pulmonary neuroendocrine cells in explant culture. *Lab Invest* 1997;77:449-57.
11. Sidhu GS. The endodermal origin of digestive and respiratory tract APUD cells. *Am J Pathol* 1979;96:5-20.
12. Zaha A, Schrank A, Loreto, ELS, Ferreira, HB, Schrank, IS, Rodrigues, JJS et al. *Biologia Molecular Básica*. 3a ed. RGS (Porto Alegre): Mercado Aberto; 2003.
13. Ito T, Udaka N, Ikeda M, Yazawa T, Kageyama R, Kitamura H. Significance of proneural basic helix-loop-helix transcription factors in neuroendocrine differentiation of fetal lung epithelial cells and lung carcinoma cells. *Histol Histopathol* 2001;16:335-43.
14. Jan YN, Jan LY. Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu Rev Genet* 1994;28:373-93.
15. Kageyama R, Nakanishi S. Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:659-65.
16. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 1992;6:2620-34.
17. Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges MW, Feder JN, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW. Conservation of the *Drosophila* lateral pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (Hes-1) directly represses achaetes-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5355-60.
18. Westerman BA, Breuer RH, Poutsma A, Chhatta A, Noordt LA, Koolen MG, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor profiling of lung tumors shows aberrant expression of the proneural gene atonal homolog 1 (ATO1, HATH1, MATH1) in neuroendocrine tumors. *Int J Biol Markers* 2007;22(2):114-23.
19. Ito T, Udaka N, Okudela K, Yazawa T, Kitamura H. Mechanisms of neuroendocrine differentiation in pulmonary neuroendocrine cells and small cell carcinoma. *Endocrine Pathology* 2003;14:133-9.
20. Ball DW, Azzoli CG, Baylin SB, Chi D, Duo S, Donis-Keller H, Kumaraswamy A, Borges M, Nelkin BD. Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5648-52.
21. Chen H, Biel MA, Borges MW, Feder JN, Thiagalingam A, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW. Tissue-specific expression of human achaete-scute homolog-1 in neuroendocrine tumors: transcriptional regulation by dual inhibitory regions. *Cell Growth Differ* 1997;8:677-86.
22. Gestblom C, Grynfeld A, Ora I, Ortift E, Larsson C, Axelson H, Sandstedt B, Cserjesi P, Olson EN, Pahlman S. The Basic helix-loop-helix transcription factor dHNA1, a marker gene for the developing human sympathetic nervous system, is expressed in both high- and low-stage neuroblastoma. *Lab Invest* 1999;79:67-79.
23. Soderholm H, Ortoft E, Johansson I, Ljungberg J, Larsson C, Axelson H, Pahlman S. Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:551-63.
24. Borges M, Linnoila RI, Van De Velde HJK, Chen H, Nelkin BD, Marby M, Baylin SB, Ball DW. An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature* 1997;386:852-5.
25. Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudoh T, Guillemot F, Kageyama R, Kitamura H. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine cell differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development* 2000;127:3913-21.
26. Silva Junior CT, Cardoso GP, Santos LM, Zamboni M, Araújo EGA. Diferenciação neuroendócrina dos carcinomas brônquicos. *Pulmão RJ* 2006;15(1):39-43.
27. Westerman BA, Neijenhuis S, Poutsma A, Steenberg RDM, Breuer RHJ, Egging M, van Wijk IJ, Oudejans CBM. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction measurement of HASH (SASCL 1), a marker for small cell lung carcinomas with neuroendocrine features. *Clin Cancer Res* 2002;8:1082-6.
28. Chen H, Carson-Walter EB, Baylin SB, Nelkin BD, Ball DW. Differentiation of medullary thyroid cancer by C-Raf-1 silences expression of the neural transcription factor human achaete-scute homolog-1. *Surgery* 1996;120:168-73.
29. Rostomily RC, Bermingham-McDonogh O, Berger MS, Tapscott SJ, Reh TA, Olson JM. Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1997;57:3526-31.
30. Yazawa T, Ito T, Kamma H, Suzuki T, Okudela K, Hayashi H, Horiguchi H, Ogata T, Mitsui H, Ikeda M, Kitamura H. Complicated mechanisms of class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma. *Am J Pathol* 2002;161:291-300.
31. Nakakura EK, Watkins DN, Schuebel KE, Sriuranpong V, Borges MW, Nelkin BD, Ball DW. Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4010-5.