

Artigo de Revisão

Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo*

Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking

RICARDO LUIZ DE MENEZES DUARTE¹, MARCOS EDUARDO MACHADO PASCHOAL²

RESUMO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado umnexo causal entre tabagismo e carcinoma de pulmão. Embora a maioria dos cânceres de pulmão esteja associada com tabagismo, somente uma minoria de grandes tabagistas desenvolve essa malignidade, o que leva ao conceito de que fatores genéticos afetam a susceptibilidade individual. As principais alterações moleculares no câncer de pulmão são: genes de supressão tumoral, proto-oncogenes e fatores de crescimento, atividade da telomerase e *status* de metilação de promotores. Fatores estimuladores da angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular) e fatores relacionados à proliferação e apoptose de células tumorais (receptor para fator de crescimento epidérmico, p53, K-ras, retinoblastoma, BCL-2) são bem conhecidos. Vários desses fatores genéticos foram investigados, porém nenhum deles apresentou seletividade no que diz respeito à importância prognóstica ou eficácia terapêutica. Estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer de pulmão devem considerar essas alterações genéticas precoces para promover o seu reparo ou eliminar as células tumorais.

Descritores: Tabagismo; Neoplasias pulmonares; Marcadores genéticos; Prognóstico

ABSTRACT

Epidemiological studies have demonstrated a causal relationship between smoking and lung cancer. Although most lung cancer cases are linked to smoking, only a minority of heavy smokers develop lung cancer, leading to the notion that genetic factors affect individual susceptibility. The principal molecular changes in lung cancer are seen in tumor suppressor genes, proto-oncogenes, growth factors, telomerase activity, and methylation status of promoters. Well-known agents include angiogenesis-stimulating factors (such as vascular endothelial growth factor), as well as factors related to tumor cell proliferation and apoptosis (epidermal growth factor receptor, p53, K-ras, retinoblastoma and BCL-2). Several of these genetic factors have already been investigated, but no single parameter has yet presented sufficient selectivity regarding prognostic value or therapeutic efficacy. Treatment strategies to cure lung cancer should focus on these early genetic lesions in order to promote their repair or to eliminate these lung cancer cells.

Keywords: Smoking; Lung neoplasms; Genetic markers; Prognosis

* Trabalho realizado na Divisão de Tisiologia e Pneumologia do Instituto de Doenças do Tórax (IDT). Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

1. Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, Setor Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

2. Doutor em Ciências pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro - IBCCF - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Ricardo Luiz de Menezes Duarte. Av. Brigadeiro Trompowski, s/nº, 3º andar. SME da Pneumologia, sala 03F91. Ilha do Fundão - CEP 21941-590, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Tel.: 55 21 2562-2536. E-mail: rlmd.hucff@bol.com.br

Recebido para publicação em 23/3/05. Aprovado, após revisão, em 16/6/05.

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão (CP) representa a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres em estatísticas norte-americanas com, aproximadamente, 170.000 mortes ao ano. Corresponde a 1/6 de todas as mortes por câncer. No mundo, o CP é o que acomete o maior número de pessoas (cerca de 1,2 milhão de casos novos ao ano). Menos de 15% dos pacientes com CP sobrevivem em cinco anos porque, geralmente, apresentam-se com doença avançada. Cerca de 80% dos CP são carcinomas de pulmão não pequenas células (CPNPC): escamoso, adenocarcinoma, grandes células. O restante são carcinomas de pulmão pequenas células (CPPC). Esta divisão tem importância no plano terapêutico e prognóstico.⁽¹⁻²⁾

Em estatísticas norte-americanas, a incidência de CP estabilizou-se no período de 1995 a 2001. Entretanto, entre as mulheres houve um aumento na incidência de 0,3% ao ano no período de 1987 a 2001. Em homens, os três principais cânceres correspondem aos de próstata, pulmão, e cólon e reto (56% dos cânceres diagnosticados, sendo o de próstata responsável por 33%). Em mulheres predominam os tumores de mama, pulmão, e cólon e reto (55% dos cânceres diagnosticados, sendo o de mama responsável por 32%).⁽¹⁻²⁾

A incidência de CP no Brasil tem aumentado nas últimas décadas e sua mortalidade permanece elevada, de forma similar ao que acontece no restante do mundo.⁽³⁻⁷⁾ No Brasil, o CP é a primeira causa de morte por câncer entre homens e a segunda entre as mulheres. O número de casos novos de CP estimado para o Brasil em 2005 é de 17.110 entre homens e de 8.680 entre as mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 19 casos novos/100.000 homens e 9/100.000 mulheres. Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o CP em homens é o segundo mais comum nas regiões Sul (36/100.000), Sudeste (23/100.000) e Centro-Oeste (15/100.000), sendo nas regiões Norte e Nordeste o terceiro mais freqüente (8/100.000 em ambas as regiões). Entre as mulheres é o quarto mais comum nas regiões Sul (16/100.000), Sudeste (11/100.000), Centro-Oeste (8/100.000) e Norte (5/100.000), sendo o quinto mais freqüente na região Nordeste (5/100.000).⁽⁵⁻⁷⁾

TABAGISMO COMO FATOR DE RISCO

Vários são os fatores de risco para o CP: asbes-

to, radônio, exposição ocupacional e ambiental e fatores genéticos. Porém, o mais importante é o tabagismo, responsável por 80% do risco atribuível entre homens e 45% dos casos entre as mulheres.⁽²⁾ As taxas de incidência de CP são, geralmente, mais altas em homens do que em mulheres. Tem sido observado que as taxas em mulheres vêm aumentando e as taxas nos homens têm se mantido estáveis, com tendência ao declínio.⁽³⁻⁷⁾ O CP permanece como uma doença altamente letal. A sobrevivência média cumulativa em cinco anos é de 13% a 21% em países desenvolvidos e de 7% a 10% em países em desenvolvimento, com uma média mundial estimada de 11%.⁽³⁻⁷⁾

A associação causal entre tabagismo e CP é aceita desde a década de 1950, quando estudos tipo caso controle registraram um risco relativo de 10.⁽⁸⁻⁹⁾ Estudos de coorte mostraram que a mortalidade de CP aumentava proporcionalmente com a carga tabágica, sendo este dado mais importante do que a concentração de alcatrão e nicotina no tabaco.⁽⁸⁻¹⁰⁾ Os dados epidemiológicos em tabagismo e CP preenchem critérios de causalidade: consistência dos resultados, força de associação, especificidade e seqüência temporal entre exposição e desfecho, além de plausibilidade biológica.⁽¹¹⁾

Taxas de incidência de CP em um determinado país refletem o seu consumo de tabaco. Inquérito domiciliar, realizado no Brasil, apontou que o percentual de fumantes regulares de cigarro variou entre 13% e 25% e os maiores percentuais foram observados nos municípios de Porto Alegre (RS), Curitiba (PR) e Florianópolis (SC). Foi observada alta prevalência de tabagismo entre adolescentes (entre 9% e 27%), bem como uma idade média de iniciação precoce, principalmente entre mulheres. Estes resultados reforçam a importância de ações de combate ao tabagismo, principalmente entre as mulheres e jovens.⁽⁵⁻⁷⁾

Cerca de 87% dos CP são relacionados à exposição ao tabaco. O risco relativo para desenvolvimento de CP em tabagistas é 24 vezes maior do que em não tabagistas. O risco relativo de CP em ex-tabagistas, embora menor do que nos tabagistas, é maior do que em não tabagistas, o que reforça a necessidade de medidas de prevenção primária, pois mais de 50% dos CP ocorrem em ex-tabagistas. O uso de quimioprevenção em ex-tabagistas repousa na evidência de dano genético persistente na via aérea tanto quanto no papel etiológico do

tabaco nas alterações genéticas. Alguns desses agentes são: retinóides, carotenos, e N-acetilcisteína, com resultados conflitantes de benefício.^(1-2,11)

O tabagismo passivo também aumenta o risco de desenvolvimento de CP. Ex-tabagistas têm uma redução progressiva do risco após abandono do hábito num período mínimo de cinco a vinte anos.⁽²⁾ Embora a maioria dos CP esteja relacionada ao tabagismo, somente uma minoria de pacientes com elevada carga tabágica desenvolve CP, pois fatores genéticos podem influenciar a susceptibilidade individual.⁽¹²⁾ A incidência dos diferentes tipos histológicos no CP sofre influência do tabagismo: o carcinoma de células escamosas e, principalmente, o CPPC têm uma estreita e forte ligação com o tabaco, influência esta maior que no adenocarcinoma, que pode ser nitidamente mais freqüente entre as mulheres.⁽¹³⁻¹⁴⁾

TABAGISMO COMO FATOR PROGNÓSTICO

Diversos são os fatores clínicos, anatomopatológicos, radiológicos e/ou laboratoriais relacionados à apresentação clínica, resposta ao tratamento e sobrevida no CP, tais como: tipo histológico, perda ponderal, *performance status*, estadiamento e marcadores tumorais.⁽¹⁵⁾ Apesar da variedade de fatores prognósticos, a complexidade e o custo impedem a sua ampla utilização na pesquisa e na prática clínica. Estudos sobre prognóstico têm permitido a escolha de condutas mais adequadas, de acordo com a tolerância ao tratamento, chance de resposta e provável sobrevida.⁽¹⁶⁾

Desde a década de 1960 há interesse em descrever fatores clínicos, radiológicos e laboratoriais que permitam melhor análise do prognóstico.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ O tabagismo foi considerado preditor importante e independente no encurtamento da sobrevida de pacientes com CP, através de estudo com 1.155 pacientes, em que as principais variáveis analisadas foram: idade, sexo, histologia e estadiamento.⁽¹⁷⁾

O tabagismo está associado a outros fatores que podem contribuir para uma pior sobrevida no CP: pior nível socioeconômico,⁽¹⁸⁾ pior estado nutricional,⁽¹⁹⁾ presença de doenças associadas,⁽²⁰⁾ imunodepressão⁽²¹⁾ e mutações que promovem carcinogênese.⁽²²⁾ Destes, a presença de doenças associadas parece ser o fator mais importante, pois o tabagismo está associado a diversas outras doenças, além do CP.

Pacientes tabagistas com CP podem morrer através de várias doenças associadas ao tabaco. Embora seja comum o conceito de que quase todos os pacientes com CP morram desse mal, isto não é sempre verdade, pois 20% a 40% dos pacientes com CP não metastático morrem sem evidência de progressão da doença.⁽²³⁾ Assim, a associação entre tabagismo e sobrevida diminuída, pelo menos em pacientes com CP não metastático, pode se dar pelas co-morbidades relacionadas ao tabaco.

Pacientes tabagistas podem ter menor sobrevida pelo fato de receberem tratamento menos completo, possivelmente porque o tabagismo está associado a um nível socioeconômico mais baixo, prejuízo na função pulmonar ou a co-morbidades, o que faz com que estes pacientes sejam excluídos de um tratamento mais radical.⁽²⁴⁾

O IMPACTO DO TABAGISMO NA SAÚDE E NAS MULHERES

A Organização Mundial de Saúde estima que 5 milhões de pessoas morrem por ano em todo o mundo devido ao tabaco.⁽²⁵⁾ A exposição à fumaça do tabaco, através da inalação de grandes doses, é causa de câncer, doenças cardiovasculares e respiratórias. As taxas de CP entre fumantes leves (de um a nove cigarros/dia) são, em média, seis vezes maiores do que em não-fumantes, o que indica que o tabagismo é um grande fator de risco, mesmo quando a exposição é baixa, pois não há níveis seguros de exposição. Mesmo fumantes que não tragam (de charutos e cachimbos) têm um risco elevado de CP, cerca de dez vezes maior que os não fumantes.⁽²⁶⁾

Mulheres podem ser mais susceptíveis aos carcinógenos do tabaco do que homens, pois com a mesma carga tabágica que os homens apresentam taxas mais elevadas de CP.⁽¹⁴⁾ A mortalidade por CP entre as mulheres está aumentando de forma mais rápida do que entre os homens. A mortalidade por este tipo de câncer, de 1979 a 1999, mostrou um crescimento de 57% entre os homens e de 122% entre as mulheres.⁽²⁵⁾

CIGARROS DE BAIXOS TEORES, TABAGISMO PASSIVO E POLUIÇÃO TABAGÍSTICA AMBIENTAL

Depois que foi demonstrado que cigarros po-

diam causar câncer, os fabricantes de cigarros passaram a colocar filtros nos mesmos, desenvolvendo cigarros de baixos teores de alcatrão e nicotina. Os dispositivos de ventilação dos filtros são orifícios ou perfurações que servem para diluir a fumaça inalada pelo fumante com ar, reduzindo a concentração das emissões de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono.⁽²⁷⁾

Uma forma de o fumante compensar a redução da emissão de nicotina, devido à diluição da fumaça com o ar que entra pelos poros do filtro do cigarro, é aumentar o volume da fumaça inalada. Ao mudar de uma marca de teor regular para outra de baixo teor, o fumante imediatamente realiza um processo de compensação, através de mudanças na forma de fumar, para obter a nicotina necessária para satisfazer sua dependência, através de uma inalação mais profunda.⁽²⁷⁾

Um estudo de coorte⁽²⁸⁾ analisou o risco de desenvolvimento de CP entre tabagistas de cigarros de conteúdo médio, baixo e muito baixo de alcatrão, fiéis à mesma marca de tabaco por mais de dez anos, com ex-tabagistas e não-tabagistas. Independentemente do teor de alcatrão, os tabagistas tinham maior risco de CP do que ex-tabagistas e não-tabagistas. O risco de CP foi semelhante entre os tabagistas de médio, baixo e muito baixo teores de alcatrão, o que é compatível com o fenômeno do ato compensatório de fumar.⁽²⁸⁾

A queima dos derivados do tabaco leva à formação de duas correntes de fumaça: a corrente principal (gerada durante as tragadas e que entra pela boca do fumante) e a secundária (formada no intervalo entre as tragadas e emitida livremente da ponta do cigarro aceso ao ambiente). A poluição tabagística ambiental é a fumaça do tabaco liberada para o ambiente e que as pessoas inalam involuntariamente. Pesquisas sobre tabagismo passivo mostram que entre não-fumantes expostos de forma crônica à poluição tabagística ambiental o risco de CP é 30% maior do que entre os não fumantes não expostos.⁽²⁹⁾ Os primeiros estudos sobre tabagismo passivo avaliaram o risco entre mulheres não-fumantes e mostraram que o risco de morte por CP era mais elevado entre as mulheres não fumantes casadas com fumantes, do que entre mulheres não fumantes casadas com não fumantes.⁽³⁰⁻³¹⁾

TABAGISMO E ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER DE PULMÃO

A fumaça do tabaco contém mais de 4.000 componentes já identificados, sendo que há mais de 60 carcinógenos presentes. As principais classes de carcinógenos na fumaça do tabaco são os hidrocarbonos policíclicos (como benzopireno), as nitrosaminas e as amins aromáticas. Estas substâncias promovem dano no ácido desoxirribonucleico (DNA) por ativação de pró-carcinógenos (enzimas de fase I), o que é contrabalançado pela capacidade de “eliminar” carcinógenos (enzimas de fase II).⁽³²⁾ A capacidade de reparo do DNA é significativamente menor em pacientes com CP do que em controles.⁽³²⁾

Cerca de 50 genes de supressão tumoral e mais de 100 oncogenes já foram descritos e, como eles participam intimamente da regulação do crescimento e divisão celular, o CP pode ser considerado uma doença do ciclo celular.⁽³²⁻³⁴⁾ O modelo do ciclo celular consiste de uma fase S (síntese do DNA) e uma fase M (mitose), intercaladas por 2 fases (G1 e G2).⁽³³⁾

Substâncias presentes no tabaco podem atuar como carcinógenos ou, geralmente, pró-carcinógenos, que necessitam ser ativados em carcinógenos por enzimas de fase I (codificadas pelos genes do citocromo P450 - CYP). Estes carcinógenos podem se ligar ao DNA, e induzir mutações e carcinogênese.⁽³²⁻³⁴⁾ A família CYP é dividida em dez subfamílias (CYP1-10) e as subfamílias CYP1-4 são primariamente envolvidas no metabolismo de drogas.^(32,34) Enzimas de fase I ativam metabolicamente pró-carcinógenos em intermediários tóxicos à célula que podem se ligar ao DNA ou ser transformados por enzimas de fase II, por conjugação, em intermediários hidrossolúveis que são excretados pela célula. Indivíduos eficientes no metabolismo de fase I e deficientes no metabolismo de fase II acumulam intermediários tóxicos à célula, o que aumenta o risco de CP. As enzimas envolvidas na ativação e conjugação de constituintes do tabaco são o citocromo P450, enzimas de fase I (CYP1A1, CYP2E1) e enzimas de fase II como a glutathione S-transferase (GST), que contém cinco famílias: alfa (GSTA), sigma (GSTS), mu (GSTM), pi (GSTP) e teta (GSTT), além de N-acetiltransferases. Vários estudos já comprovaram a associação do tabagismo e alterações moleculares relaciona-

Quadro 1 - Principais marcadores moleculares encontrados no câncer de pulmão

Genes de supressão tumoral	p53, Rb, p16, p21
Proto-oncogenes	K- <i>ras</i> , c- <i>myc</i> , c- <i>erB</i> -1 e 2, HGF, HER-2
Telomerases	hTERT
Hipermetilação e fatores de crescimento	GRP/BN, TGF- β , FDGF, PTHrP, IGF-I e II
Apoptose e angiogênese	BCL-2, VEGF
Amplificação gênica	HER-2

Fonte adaptada a partir das referências 2, 15 e 22.

das ao CP.^(15,22,34-42) Estas alterações principais e suas frequências no CPNPC e CPPC estão resumidas nos Quadros 1 e 2.

GENES DE SUPRESSÃO TUMORAL

Há duas classes de oncogenes: dominantes e recessivos (ou genes de supressão tumoral). Oncogenes dominantes, diferentemente dos recessivos, são facilmente identificados, pois têm efeito genético dominante em converter uma célula normal em maligna. Para isto basta afetar somente um de seus dois alelos, diferentemente dos recessivos, que necessitam que a mutação afete o par de genes para a carcinogênese ocorrer. Mecanismos moleculares de ativação de oncogenes incluem amplificação, mutação pontual, translocação e hiperexpressão da proteína ou do nível de transcrição do gene.^(2,15)

A primeira comprovação dos genes de supressão tumoral foi a identificação do gene retinoblastoma (Rb), sendo que defeitos no Rb são quase universais no CPPC, mas observados em somente

30% dos CPNPC.⁽³⁵⁾ O gene Rb, localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q), codifica uma fosfoproteína nuclear reguladora da divisão celular. O papel da expressão alterada do Rb e do p53 foi estudado no CPNPC.⁽³⁵⁾ Algumas anormalidades na via do p53 e do Rb (expressão aumentada de ciclina D1 e mutações no p53) significaram pior prognóstico, porém, como há uma grande complexidade e interação entre diversas proteínas, estes resultados necessitam ser ainda avaliados.⁽³⁵⁾

O gene de supressão tumoral p53 é o gene que mais comumente sofre mutação no CP. O gene p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p), e a mutação do mesmo, quando relacionada ao CP e ao tabagismo, é quase que exclusivamente no códon 157. Mutações no gene p53 promovem transições guanina-timina (G-T). A proteína p53 normal pode induzir o p21, resultando em defosforilação do Rb e inibição do ciclo celular. O gene p53 regula o crescimento celular na interface G1-S do ciclo celular e tem papel importante na indução de apoptose nas células com dano no DNA.⁽³⁶⁻³⁷⁾

A proteína p53 é importante na apoptose de células com DNA lesado e mutações no gene p53 comumente refletem exposições a carcinógenos ambientais (por exemplo, tabagismo e CP).⁽³⁶⁾ A proteína p53 na sua forma selvagem é reguladora do crescimento celular e mutações no gene p53 podem eliminar a produção da proteína p53 ou então produzi-la de forma ineficaz. A proteína p53 na sua forma mutante tem vida média mais longa do que o tipo selvagem, proporcionando altos níveis nas células malignas. O gene p53 codifica um fator de transcrição nuclear que se liga ao promotor p21 induzindo sua expressão e inibindo a progressão do ciclo celular no estágio G1/S, enquanto que a proteína p53, na sua forma mutante, não é capaz de ativar o p21, e, portanto, considera-se o gene p53 como “guardião do genoma” e protetor das células do aparelho respiratório de carcinógenos ambientais.⁽³⁶⁻³⁷⁾ Mutações no gene p53 no CP correlacionam-se fortemen-

Quadro 2 - Principais diferenças nas frequências dos marcadores moleculares no câncer de pulmão

Marcador molecular	CPNPC (%)	CPPC (%)
p53	40-60	40-70
Rb	30	~100
p16	10-40	<1
K- <i>ras</i>	15-20	<1
c- <i>myc</i>	10	80-90
BCL-2	12-25	75-80
c- <i>erB</i> -2	25	<5
FHIT	40	80
Telomerases	80-85	~100
GRP/BN	Raro	20-60

CPNPC: carcinoma de pulmão não pequenas células;
CPPC: carcinoma de pulmão pequenas células.

Fonte adaptada a partir das referências 2, 15 e 22.

te com o tabagismo, com expressão anormal em 40% a 70% no CPPC e 40% a 60% no CPNPC (sendo no tipo histológico escamoso mais freqüente do que no adenocarcinoma).⁽³⁶⁻⁴⁰⁾

Anormalidades no *status* de p53 não parecem estar relacionadas com o prognóstico em tumores pulmonares mistos, mas parecem conferir um pior prognóstico em pacientes com CPNPC.⁽³⁷⁾ O p53 pode induzir bax, que é um gene promotor de apoptose.⁽¹⁵⁾ Enquanto a importância das mutações no p53 na patogênese do CP é óbvia, até o momento não está claro se essas alterações afetam o prognóstico, pois há resultados conflitantes.⁽¹⁵⁾ Em metanálise sobre o p53, mostrou-se que o mesmo não tem valor prognóstico no CPPC, porém no CPNPC ele é fator prognóstico desfavorável em todos os estádios.⁽³⁷⁾

O p21 inibe a replicação do DNA, sendo que sua expressão aumenta com a expressão aumentada do p53. No CP a expressão do p21 encontra-se aumentada em 65% a 75% no CPNPC, especialmente em tumores bem diferenciados.^(2,15,41) Os resultados sobre a importância do p21 como fator prognóstico também são conflitantes.^(15,41) A via de supressão tumoral da proteína p16 sofre mutação em muitos cânceres. Ela é detectada em 10% a 40% no CPNPC e em menos de 10% no CPPC,^(2,15,42) sendo que a hipermetilação do p16 (INK4a) é um fator prognóstico desfavorável, principalmente no adenocarcinoma. Há pior prognóstico no CPNPC ressecado associado à expressão de p53 e p16, principalmente nos estádios iniciais.⁽⁴²⁾

PROTO-ONCOGENES E ESTIMULADORES DO CRESCIMENTO

Há três proto-oncogenes da família ras: K-ras, N-ras e H-ras.^(38,43-44) Estes genes codificam proteínas ligadoras do grupo guanosina trifosfato, conhecidas como p21ras, que são facilmente relacionadas e têm semelhança estrutural com a proteína G.^(15,41,43-44) Estas proteínas localizam-se no lado interno da membrana celular e participam do sinal de transdução. Ativação do K-ras por mutação pontual ocorre em 50% dos adenocarcinomas de pulmão, o que pode ser verificado pela reação em cadeia da polimerase em células colhidas pelo lavado broncoalveolar de pacientes com CP.^(2,15,43-44) Esta mutação resulta em uma única modificação no aminoácido da proteína, o que leva a uma impor-

tante redução na atividade da guanosina trifosfatase intrínseca, permanecendo a proteína em estado ativo de ligação com a guanosina trifosfato, que impede a sua liberação. Estas mutações, uma vez adquiridas, permanecem estáveis, tanto no tumor primário quanto nas metástases. A presença de mutações no códon 12 no oncogene K-ras pode conferir um pior prognóstico nos pacientes com esta malignidade, principalmente quando terapia multimodal é realizada, porém isto é controverso.^(2,15,43,45) A maioria das mutações no ras são defeitos na atividade da guanosina trifosfatase, que é a forma ativa do K-ras, e a hipermetilação do promotor de RASSF 1A (*Ras association domain family 1*) em combinação com essa mutação tem efeito sinérgico como fator de prognóstico desfavorável.^(44,46) Mutações do K-ras ocorrem em 20% a 50% dos adenocarcinomas (15% a 20% de todos os CPNPC), porém raramente ocorrem no CPPC.^(2,15,46)

Mutações no oncogene K-ras associam-se fortemente ao tabagismo, geralmente transversões G-T associadas a hidrocarbonetos policíclicos e nitrosaminas.⁽⁴⁷⁾ Comumente, a mutação K-ras em um adenocarcinoma é fator de pior prognóstico, inclusive no CPNPC completamente ressecado.⁽³⁸⁾ Mutações em outros membros da família ras (N-ras e H-ras) ocorrem com menor freqüência no CPNPC e são raras no CP. O produto protéico do gene ras (p21ras) tem sido também demonstrado como importante fator prognóstico no CPNPC.⁽⁴³⁻⁴⁷⁾ Mutações no gene K-ras têm sido detectadas em biópsias brônquicas de indivíduos fumantes sem evidências de CP, podendo ainda ser encontradas no escarro antes do diagnóstico da malignidade, atuando como marcadores de pré-malignidade.⁽⁴³⁻⁴⁷⁾

A família myc de proto-oncogenes inclui proteínas nucleares que são capazes de se ligar ao DNA e atuar na regulação da transcrição. A família myc possui 3 membros: c-myc, N-myc e L-myc. O proto-oncogene c-myc apresenta-se amplificado principalmente no CPPC (80% a 90%) e, menos comumente, no CPNPC (cerca de 10%), e sua amplificação tem sido associada a um curso mais agressivo no CPPC. Essa proteína tem expressão aumentada em amostras tumorais, quando comparadas com amostras de tecido pulmonar não neoplásico. A expressão dos genes N-myc correlaciona-se a uma pior resposta à quimioterapia. A amplificação dos genes myc também ocorre no CPNPC, porém isto até o momento é provido de importância clínica.⁽⁴⁸⁾

Alguns oncogenes exercem seus efeitos através da hiperprodução de proteínas codificadoras normais, o que sugere um defeito regulatório na transcrição do gene ou na amplificação gênica. Os genes e produtos proteicos que comumente atuam desta forma são o c-erbB-1 e o c-erbB-2, ambos receptores tirosinas-cinases. O primeiro é mais frequentemente encontrado no CPNPC, especialmente no carcinoma escamoso (65% a 90%), porém não há relação com o prognóstico. O proto-oncogene c-erbB-2 é mais frequentemente encontrado nos adenocarcinomas.⁽⁴⁹⁾

O proto-oncogene c-erbB-1, quando ligado à membrana, codifica um receptor de crescimento tirosina-cinase, que é o receptor para fator de crescimento epidérmico. A utilização do gene c-erbB-1 como fator prognóstico no CP é controversa. O c-erbB-2 está relacionado estruturalmente ao c-erbB-1 e sua proteína codificadora, chamada HER2, também é expressa em células epiteliais das vias aéreas do pulmão normal. A HER2, que é uma proteína transmembrana que possui atividade tirosina-cinase, é co-produzida com o receptor para fator de crescimento epidérmico em muitos adenocarcinomas e o seu nível sérico correlaciona-se com a carga tumoral. Ela encontra-se em níveis mais elevados (> 22U/ml) nos tumores IIIB e IV do CPNPC (notadamente adenocarcinoma), promovendo pior prognóstico.^(2,15,49) A expressão aumentada de c-erbB-2 é rara no CPPC (< 5%), porém pode ser encontrada em 25% no CPNPC.^(2,15,49)

A mutação do K-ras, quando associada a outras alterações moleculares, tem mais valor do que o K-ras isoladamente.⁽¹⁵⁾ A associação entre mutações do K-ras e expressão aumentada de p185 piora o prognóstico no adenocarcinoma, o mesmo acontecendo nos pacientes com CPNPC ressecados, quando há associação de três marcadores (p53, K-ras e c-erbB-2).⁽¹⁵⁾

Outra tirosina-cinase de membrana é o fator de crescimento do hepatócito, que estimula a proliferação de células epiteliais, estimula o fenômeno mitótico do epitélio brônquico humano e de células alveolares do tipo II, estando expresso principalmente no CPNPC, conferindo pior prognóstico. O fator de crescimento do hepatócito é um mediador de angiogênese, motilidade celular e invasão. É expresso em células epiteliais brônquicas normais e na maioria dos CPNPC, porém é raramente produzido no CPPC.⁽⁵⁰⁾

ATIVAÇÃO DE TELOMERASES

A ativação de telomerasas é um marcador potencial de CP. Sua atividade encontra-se muito baixa ou ausente em tecidos não neoplásicos, mas, na maioria das células cancerosas, sua atividade está presente ocasionando “imortalidade” celular.⁽⁵¹⁻⁵²⁾ A integridade dos telômeros é fundamental para a manutenção da estabilidade cromossômica e para prevenir fusão de cromossomos e translocações.⁽⁵¹⁻⁵²⁾

Telômeros são seqüências protetoras que constituem o final dos cromossomos e que estão envolvidas em praticamente todos os tipos de cânceres no homem. Os três principais componentes da telomerase humana (componente ácido ribonucleico, proteína associada à telomerase e subunidade catalítica) apresentam-se com expressão aumentada no CP. Aproximadamente 100% dos CPPC e 80% a 85% dos CPNPC apresentam níveis elevados de atividade desta enzima. Atividade de telomerase muito aumentada está associada a estádios avançados de CPNPC,⁽⁵¹⁻⁵²⁾ porém pode ser encontrada no carcinoma *in situ*, o que implica envolvimento de estádios iniciais do CP. Atividade de telomerase foi detectada principalmente nas amostras de epitélio brônquico anormal: hiperplasia (em 71%), metaplasia (80%), e carcinoma *in situ* (100%).⁽⁵²⁾ A aquisição de atividade de telomerase representa um evento-chave na tumorigênese, sendo importante marcador molecular de CP.⁽⁵¹⁻⁵²⁾

HIPERMETILAÇÃO E FATORES DE CRESCIMENTO

No CPNPC, a hipermetilação do promotor de p16 contribui para a diminuição do nível de transcrição do gene, o que ocorre em estádios iniciais na carcinogênese pulmonar e se correlaciona fortemente com o tabagismo.⁽⁵¹⁻⁵³⁾ Estímulos de crescimento autócrino e parácrino estão presentes no CP como consequência da expressão de fatores de crescimento, peptídeos reguladores e receptores pelas células malignas ou por células adjacentes normais. A maioria, porém, é representada por produtos de proto-oncogenes.⁽²⁾ Dentre estes fatores salientamos a bombesina/peptídeo liberador de gastrina, com expressão em 20% a 60% no CPPC, e mais raramente no CPNPC.⁽⁵³⁾

O fator de crescimento transformador-beta é uma citocina inflamatória do pulmão, que pode se

ligar a integrinas que são expressas pelas células tumorais. Este fator de crescimento pode atuar inibindo a fase G1/S, além de produzir p21 e expressar c-myc.^(41,54) O fator de crescimento transformador-beta-1 pode afetar a angiogênese tumoral, desempenhar um importante papel na progressão tumoral no CPNPC e atuar como preditor independente de sobrevida no adenocarcinoma. Outros fatores de crescimento implicados são: fator de crescimento derivado de plaquetas, proteína relacionada ao hormônio da paratireóide e fatores de crescimento insulina-símile.^(2,15)

A expressão do Ki-67 é um marcador prognóstico nos pacientes com CPNPC que foram operados (principalmente adenocarcinoma), e está relacionada ao tabagismo.⁽⁵⁵⁾ Pacientes com CPNPC estágio I com hipermetilação no promotor do gene DAP cinase têm pior sobrevida em cinco anos do que aqueles que não a possuem. No CPPC, a hipermetilação regional tem sido encontrada no cromossomo 3p, porém o promotor específico permanece incerto.^(2,15,54-55)

APOPTOSE E ANGIOGÊNESE

Na apoptose há o papel do proto-oncogene antiapoptótico BCL2, cuja expressão é maior no CPPC (75% a 95%) do que no CPNPC (25% no carcinoma escamoso e 12% no adenocarcinoma).^(38,56) Pacientes com CPPC e expressão de BCL-2 apresentam maior sobrevida, porém isto é controverso no CPNPC. Tumores carcinóides típicos e atípicos cursam com baixos níveis de BCL-2.^(38,56)

Tumores necessitam de fatores angiogênicos precocemente na sua patogênese. Tal processo é um fenômeno complexo e envolve vários indutores e inibidores, resultando em proliferação celular endotelial e migração. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento do fibroblasto são importantes indutores da angiogênese.⁽⁵⁷⁾

O VEGF tem expressão aumentada no CP metastático, conferindo pior prognóstico no CPNPC. No carcinoma escamoso, o receptor do VEGF (Flt-1) é expresso constantemente, sugerindo um papel autócrino do VEGF no Flt-1, e o p53 mutante age sinergicamente com a hipóxia para expressar VEGF. O VEGF aumenta a permeabilidade microvascular e estimula o crescimento celular endotelial. Expressões aumentadas do VEGF, p53, Rb

e BCL-2 podem atuar na resistência à quimioterapia.⁽⁵⁷⁾ A expressão do VEGF é um indicador prognóstico em pacientes com CP. Ele participa da progressão tumoral por dois mecanismos: como fator de crescimento para células tumorais e como fator mitótico para células endoteliais vasculares.⁽⁵⁷⁾

O tabagismo causa perda de função do gene FHIT (*fragile histidine triad*) e carcinógenos presentes no tabaco causam deleção no alelo do FHIT, sendo que exposição continuada causa deleção no segundo alelo, levando a perda da expressão do FHIT. Esta perda de expressão é mais comum em tabagistas que em não tabagistas (75% contra 39%) e está correlacionada a um pior prognóstico (principalmente no CPNPC). A expressão do FHIT encontra-se alterada em 80% no CPPC e em 40% no CPNPC. O fator de crescimento do fibroblasto está expresso em 70% no CPNPC, porém sua importância no prognóstico permanece indefinida.^(2,15,57)

ANORMALIDADES GENÉTICAS - AMPLIFICAÇÕES, DELEÇÕES DE ALELO, MUTAÇÕES

As ampliações gênicas, deleções de alelo e mutações pontuais são comumente descritas no CP. As ampliações gênicas, como, por exemplo, do HER-2/neu, são mais comumente associadas com estádios avançados e de pior prognóstico. Mutações pontuais são mais frequentes nos estádios avançados de doença e são raramente observadas em lesões pré-malignas e em epitélio brônquico normal de fumantes. A deleção de alelos tem sido demonstrada tanto nos tumores invasivos quanto nas lesões pré-neoplásicas. Estas deleções ocasionam a perda de genes de supressão tumoral e favorecem o desenvolvimento de neoplasias. Algumas regiões cromossômicas, como os braços curtos dos cromossomos 3, 9 e 17, têm sido comumente afetadas por deficiências no CP.^(2,15,58-60)

ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS - ANEUPLOIDIAS, DELEÇÕES

Alterações numéricas como perdas ou ganhos de cromossomos também são descritas no CP e em lesões pré-malignas. Alterações cromossômicas numéricas ou aneuploidias têm sido detectadas com a citometria de fluxo. Dentre os vários métodos para

diagnóstico das anormalidades cromossômicas destacam-se o clássico bandeamento cromossômico, *spectral karyotyping* e a *fluorescence in situ hybridization*.^(2,15,58-60)

CONCLUSÕES

Apesar de novas terapias, a sobrevida no CP permanece baixa. Marcadores moleculares podem representar uma importante ferramenta na compreensão da carcinogênese pulmonar, no diagnóstico precoce, na determinação do prognóstico e na identificação de novos tratamentos para pacientes com CP.⁽⁵⁹⁾ Como a grande maioria dessas anormalidades no CP está relacionada ao tabagismo, torna-se importante enfatizar a necessidade de prevenção deste fator, principalmente em pacientes de risco elevado (grandes tabagistas).

REFERÊNCIAS

- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(1):10-30.
- Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1): 1355-67. Review.
- Zamboni M. Epidemiologia do câncer do pulmão. *J Pneumol*. 2002;28(1):41-7.
- Mendes ESPS. Câncer de pulmão: novos horizontes. *J Pneumol*. 1996;22(6):227-8.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2005: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA - Coordenação de Prevenção e Vigilância; 2004. 94 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ação global para o controle do tabaco. 1o Tratado internacional de saúde pública. 3a edição. Rio de Janeiro: INCA;2004.
- Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950;2(4682):739-48.
- Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habits; a preliminary report. *Br Med J*. 1954;(4877):1451-5.
- Hammond EC, Horn D. The relationship between human smoking habits and death rates: a follow-up study of 187,766 men. *J Am Med Assoc*. 1954;155(15):1316-28.
- Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, Laszlo J. Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*. 1984;44(12 Pt 1):5940-58. Review.
- Dresler CM, Gritz ER. Smoking, smoking cessation and the oncologist. *Lung Cancer*. 2001;34(3):315-23. Review.
- De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Brennan P, Correa P, Deneo-Pellegrini H, et al. Squamous and small cell carcinomas of the lung: similarities and differences concerning the role of tobacco smoking. *Lung Cancer*. 2005;47(1):1-8.
- Brownson RC, Chang JC, Davis JR. Gender and histologic type variations in smoking-related risk of lung cancer. *Epidemiology*. 1992;3(1): 61-4.
- Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001;34 Suppl 2:S53-8. Review.
- Sherrah-Davies E. Does postoperative irradiation improve survival in lung cancer? *JAMA*. 1966;196(4):345-7.
- Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest*. 2004;125(1):27-37.
- Stellman SD, Resnicow K. Tobacco smoking, cancer and social class. *IARC Sci Publ*. 1997; (138):229-50. Review.
- Margetts BM, Jackson AA. Interactions between people's diet and their smoking habits: the dietary and nutritional survey of British adults. *BMJ*. 1993;307(6916):1381-4.
- Ogle KS, Swanson GM, Woods N, Azzouz F. Cancer and comorbidity: redefining chronic diseases. *Cancer*. 2000;88(3):653-63.
- Thomas WR, Holt PG, Keast D. Recovery of immune system after cigarette smoking. *Nature*. 1974;248(446):358-9.
- Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res*. 2001;61(4):1309-13.
- Yu GP, Ostroff JS, Zhang ZF, Tang J, Schantz SP. Smoking history and cancer patient survival: a hospital cancer registry study. *Cancer Detect Prev*. 1997;21(6):497-509.
- Pamuk E, Makuc D, Heck K, Reuben C, Lochner K. Socioeconomic status and health chartbook: health, United States, 1998. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 1998.
- World Health Organization. World Health Report: making a difference. Geneva: World Health Organization; 1999.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Tobacco smoking. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1986. v.38.
- Thun MJ, Burns DM. Health impact of "reduced yield" cigarettes: a critical assessment of the epidemiological evidence. *Tob Control*. 2001;10 Suppl 1: i4-11.
- Harris JE, Thun MJ, Mondul AM, Calle EE. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *BMJ*. 2004;328(7431):72.
- Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315(7114):980-8.
- Hirayama T. Non smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981;282(6259):183-5.
- Trichopoulos D, Kalandidi A, Sparros L, MacMahon B. Lung cancer and passive smoking. *Int J Cancer*. 1981;27(1):1-4.
- Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res*. 1996;56(18):4103-7.

33. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274(5293):1672-7. Review.
34. Kiyohara C, Shirakawa T, Hopkin JM. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of lung cancer. *Environ Health Prevent Med*. 2002;7(1):47-59.
35. Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP, et al. Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):232-41.
36. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453-6. Review.
37. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J*. 2001;18(4):705-19.
38. Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, et al. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer*. 2003;39(9):1242-50.
39. Nishio M, Koshikawa T, Kuroishi T, Suyama M, Uchida K, Takagi Y, et al. Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol*. 1996;14(2):497-502.
40. Yoshikawa H, Nagashima M, Khan MA, McMenamin MG, Hagiwara K, Harris CC. Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. *Oncogene*. 1999;18(22):3415-21.
41. Shogi T, Tanaka F, Tanaka T, Yanagihara K, Otake Y, Hanaoka N, et al. Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(18):3865-71.
42. Cheng YL, Lee SC, Harn HJ, Chen CJ, Chang YC, Chen JC, et al. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;23(2):221-8.
43. Broermann P, Junker K, Brandt BH, Heinecke A, Freitag L, Klinke F, et al. Trimodality treatment in stage III nonsmall cell lung carcinoma: prognostic impact of K-ras mutations after neoadjuvant therapy. *Cancer*. 2002;94(7):2055-62.
44. Kim DH, Kim JS, Park JH, Lee SK, Ji YI, Kwon YM, et al. Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutation in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2003;63(19):6206-11.
45. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1990;323(9):561-5.
46. Li ZH, Zheng J, Weiss LM, Shibata D. c-k-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol*. 1994;144(2):303-9.
47. Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83(14):1024-7.
48. Kubokura H, Tenjin T, Akiyama H, Hoizumi K, Nishimura H, Yamamoto M, et al. Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;7(4):197-203.
49. Micke P, Hengstler JG, Ros R, Bittinger F, Metz T, Gebhard S, et al. c-erbB-2 expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*. 2001;92(4):474-9.
50. Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR, Landreneau RJ. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1997;57(3):433-9.
51. Wu TC, Lin P, Hsu CP, Huang YJ, Chen CY, Chung WC, et al. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer*. 2003;41(2):163-9.
52. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res*. 1997;57(12):2373-7.
53. Siegfried JM, DeMichele MA, Hunt JD, Davis AG, Vohra KP, Pilewski JM. Expression of mRNA for gastrin-releasing peptide receptor by human bronchial epithelial cells. Association with prolonged tobacco exposure and responsiveness to bombesin-like peptides. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(2 Pt 1):358-66.
54. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2001;91(5):964-71.
55. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2004;91(12):2018-25.
56. Shibata Y, Hidaka S, Tagawa Y, Nagayasu T. Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2004 ;24(3b) :1925-8.
57. Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, et al. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;46(1):77-85.
58. El-Zein R, Abdel-Rahman SZ, Conforti-Froes N, Alpard SK, Zwischenberger JB. Chromosome aberrations as a predictor of clinical outcome for smoking associated lung cancer. *Cancer Lett*. 2000;158(1):65-71.
59. Huber RM, Stratakis DF. Molecular oncology-perspectives in lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;45 Suppl 2:S209-13. Review.
60. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*. 2001;28 (2 Suppl 4):3-13. Review.