

Urologia  
Fundamental

CAPÍTULO  
47

# Biologia Molecular em Uro-oncologia

Marcelo Langer Wroclawski  
Ary Serpa Neto

## INTRODUÇÃO

Alterações marcantes vêm ocorrendo na área de pesquisa biomédica, e; cada vez mais, a ênfase tradicional de gene-gene vem sendo substituída por estudos de transcritos do RNA, de proteínas e de suas associações. Em grande parte, essa mudança se deve ao desenvolvimento do projeto Genoma Humano e a novas técnicas de análise biomolecular. Do ponto de vista do DNA, será possível analisar mutações, identificar indivíduos suscetíveis a elas e detectar perda de heterozigocidade ou amplificação de determinado gene durante o desenvolvimento de uma neoplasia. Além disso, análise proteômica permitirá determinar o perfil de expressão proteico de todas as células, suas interações, suas estruturas subcelulares e sua regulação de sua ativação.

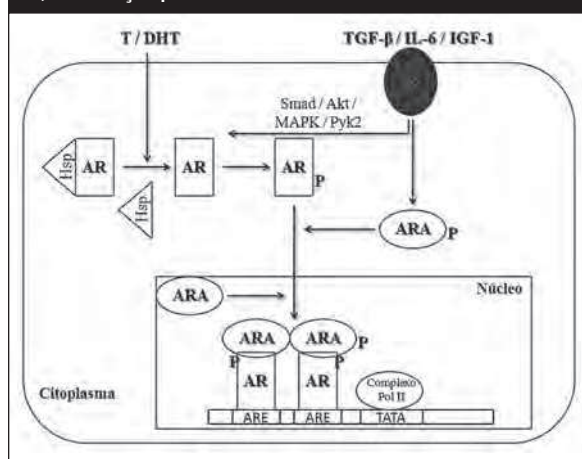
A cada dia, inúmeros trabalhos são publicados. Neste capítulo, discutiremos algumas aplicações da biologia molecular em uro-oncologia.

## CÂNCER DE PRÓSTATA

No câncer de próstata, a biologia molecular proporciona uma oportunidade para que se desenvolvam novos métodos de prevenção, detecção e de tratamento. A evolução dessa neoplasia está ligada à ação de andrôgenos nos receptores nucleares do epitélio prostático normal e resulta na expressão de genes-alvos por mecanismo dependente de ligante. Receptor androgênico (RA), presente nas células secretórias luminiais, e andrôgenos testiculares, como testosterona e 5- $\alpha$ -di-hidrotestosterona, são responsáveis pela regulação do desenvolvimento, do crescimento e da manutenção funcional da glândula prostática. Esses efeitos são mediados pelo RA nuclear, responsável por regular a transcrição de genes sensíveis ao andrôgeno. Na ausência de testosterona, o RA fica inativo e associa-se a proteínas que são liberadas com a presença do hormônio, permitindo ao receptor sofrer fosforilação e, consequentemente, alterações conformacionais necessárias para sua translocação. Por sua vez, o complexo receptor-ligante, no núcleo, sofre dimerização e liga-se a sequências específicas do DNA, chamadas elementos responsáveis ao andrôgeno. A subsequente transcrição do DNA requer interação do RA com outras proteínas reguladoras da transcrição e coativadores, agentes necessários para estabilizar o gene regulado e determinar a taxa de transcrição. Comprovou-se esse achado com o fato de, na presença

apenas de andrôgeno, células epiteliais prostáticas não conseguem se proliferar, sendo necessários fatores de crescimento, como EGF, IGF-I e II, proteína quinase A e fator de crescimento do queratinócito (KGF), para que isso acontecesse. Hipotetiza-se que isso ocorra pela capacidade que esses fatores têm de induzir a atividade transcripcional do RA mesmo na ausência de ligantes, potencializando todo processo (Figura 1).

**Figura 1 – Ação do complexo andrôgeno-RA na próstata.** Testosterona (T) e DHT ligam-se ao RA e promovem a associação de correguladores do RA (ARAs). Ocorre translocação do RA ao núcleo e ligação ao elemento responsivo ao andrôgeno (AREs) na região promotora de genes alvo. Outras vias de sinalização, como as que envolvem o TGF- $\beta$ , IL-6 e IGF-1, podem aumentar a atividade do RA via fosforilação do RA e/ou dos ARAs. Hsp, *Heat shock protein*; R, receptor de membrana; P, fosforilação proteica.



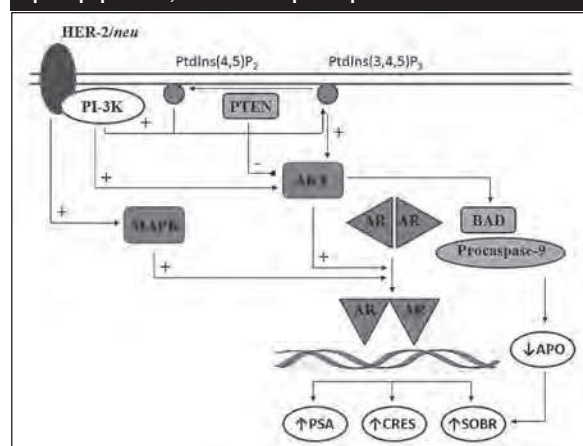
Genes regulados pelos andrôgenos têm como similaridade uma ou mais sequências de ligação ao RA (ARE, ARR, HRE) com locais de controle (Spl, CCAAT e NF-1), indutores (Ets, AP-1, NF- $\kappa$ B) e fatores de transcrição específicos do tecido. Assim, a expressão de genes regulados pelos andrôgenos envolve interações coordenadas da proteína do receptor e de outros fatores de transcrição. No contexto do câncer de próstata, o gene regulado pelo andrôgeno mais estudado é o promotor do antígeno prostático específico (PSA). Diversas vias, que incluem AP-1 e AMPc, também podem potencializar e induzir a expressão desse antígeno. Em grande parte dos tumores, inicialmente sua produção é andrôgeno-dependente e sofre grande declínio após castração química ou cirúrgica. Entretanto, na ausência do andrôgeno, o tumor invariavelmente progride para uma doença castração-resistente e um sinal precoce é a elevação do PSA que, eventualmente, pode atingir níveis mais altos do que aqueles encontrados antes do tratamento.

Muito se discute sobre os mecanismos de ação da sinalização por meio de RA nos chamados tumores androgênio-independentes, pois células neoplásicas continuam dependentes da sinalização do RA mesmo com baixos níveis séricos de androgênio circulante. Hipoteticamente, essa reativação dos RAs ocorre por diversos mecanismos. Dentre eles, estão amplificação dos RAs, mutação dos RAs, sinalização ativa dos RAs mesmo com baixos níveis de androgênio, coativadores dos RAs, ativação dos RAs independente de ligante, produção local de andrógenos aumentada, fontes alternativas de andrógeno e *up-regulation* de genes antiapoptóticos.

Entre outros fatores de crescimento relacionados ao câncer de próstata, temos aumento da expressão do HER-2 e da Akt. Em linhagens andrógeno-independentes de células prostáticas neoplásicas *in vitro*, HER-2 esteve presente em altos níveis e sua superexpressão relacionou-se a crescimento tumoral independente de andrógenos. Além disso, HER-2 conseguiu ativar o RA na ausência de ligantes e ativar a transcrição do PSA. Dessa forma, HER-2 e RA parecem agir sinergicamente na ausência de andrógenos, sugerindo um *cross-talk* entre essas duas vias. O resultado final da cadeia de ativação do HER-2 é a ativação principalmente da vias *ras*/MAPK e PI-3K. Sinalização constitutiva pela via da PI-3K é importante para prevenção de morte celular em células prostáticas, enquanto que ativação da MAPK e de vias responsivas ao androgênio não são obrigatórias para sobrevivência celular. Recentemente, comprovou-se que  $\alpha$ -catenina é o ponto de convergência do *cross-talk* existente entre as vias da PI-3K/Akt e da sinalização androgênica. Sinalização pela via da PI-3K induz fosforilação e inativação da GSK3- $\beta$ , resultando em aumento nos níveis nucleares de  $\beta$ -catenina que, por sua vez, aumenta a atividade do RA e consequentemente estimula o crescimento e a sobrevivência das células prostáticas (Figura 2).

Por fim, diversos genes de regulação celular estão envolvidos no câncer de próstata, como proto-oncogenes *myc*, *fos* e *jun*, genes reguladores de apoptose *bcl-2*, *p53* e *p21* e outros. *bcl-2* é um gene antiapoptótico envolvido em múltiplos passos da carcinogênese prostática, podendo participar da supressão da apoptose e/ou da estimulação da angiogênese tumoral. O gene *p53* codifica uma proteína reparadora do DNA, responsável pela parada do ciclo celular em G1 e pela indução da apoptose, logo, sua alteração provoca proliferação celular. Por fim, o gene *p21* inibe quinases dependentes de ciclina, também conhecido

Figura 2 – Nas células tumorais de pacientes recebendo terapia supressora de androgênios, o HER-2/neu, e possivelmente outros receptores tirosina quinase, pode ser superexpresso. HER-2/neu indiretamente ativa a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) que, por sua vez, pode fosforilar o RA, tornando-o ativo mesmo na ausência de androgênios. Outra via alternativa pela qual o HER-2/neu pode ativar o RA é pela ativação da via da proteína quinase B (Akt), que resulta em elevação nos níveis de fosfatidilinositol-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3) por causa da ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K). Outra possível via é a inativação da fosfatase de lipídios PTEN, tornando impossível a conversão do PtdIns(3,4,5)P3 de volta em seu substrato PtdIns(4,5)P2. Akt, ativada pelo PtdIns(3,4,5)P3, consegue ativar o RA, independentemente da presença de androgênios, por meio de sua fosforilação. Akt também pode ativar paralelamente vias de sobrevivência celular por meio da fosforilação e da inativação de moléculas pró-apoptóticas, como BAD e procaspase-9.

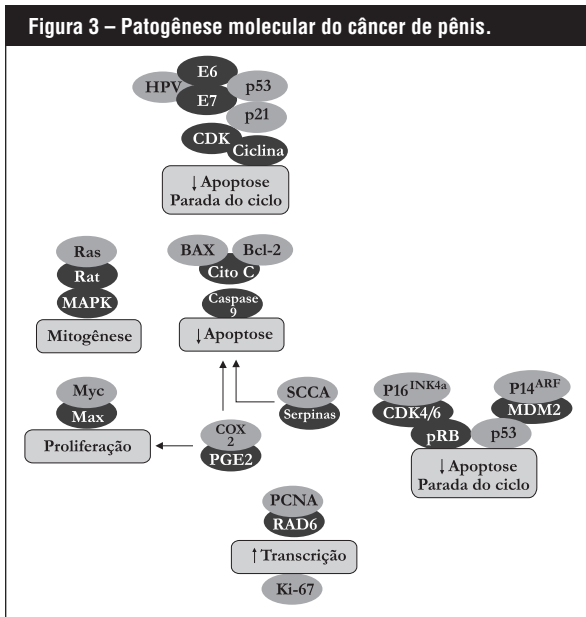


como *Waf1* ou CIP1, e codifica uma proteína que induz parada celular em G1. Sua expressão pode ser modulada pelo RA e pelo *bcl-2*.

Uma recente e expressiva descoberta foi a identificação do rearranjo cromossômico TMPRSS2:ERG. Essa fusão entre o gene regulado por andrógenos TMPRSS2 e o homólogo do oncogene E26 (ERG) é um evento molecular frequente, tendo sido encontrada em aproximadamente 50% dos cânceres de próstata. Está claro o papel importante e precoce desse evento no desenvolvimento e/ou na progressão do câncer, mas estudos atuais ainda buscam determinar essa associação com a agressividade tumoral.

## CÂNCER DE PÊNIS

A etiologia do câncer de pênis, apesar de pouco conhecida, é considerada como multifatorial (Figura 3). Sabe-se que falta de higiene e fimose são fatores importantes envolvidos em sua carcinogênese. Investiga-se a relação do câncer de pênis com doenças sexualmente transmissíveis, entre elas, infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) é a mais conhecida e a mais estudada.



Diversos estudos mostraram o DNA do HPV, principalmente subtipos 16 e 18, em amostras de pacientes submetidos a penectomia. O mecanismo pelo qual o HPV promoveria a oncogênese parece ser mediado por dois genes virais, E6 e E7, que se ligam e inativam produtos de genes supressores de tumores, como p53 e pRb (gene do retinoblastoma), ambos responsáveis pelo controle negativo da proliferação celular.

Em neoplasias positivas e negativas para HPV, diversos eventos moleculares foram evidenciados (Tabela 1). Em ambos os casos, a via mais alterada é a do p14ARF/MDM2/p53 e/ou do p16<sup>INK4a</sup>/ciclina D/Rb. Sugerem-se que esses eventos sejam marcadores tardios de carcinogênese peniana, incluindo invasão, metástase e angiogênese.

Tabela 1 – Oncogenes e genes supressores tumorais envolvidos no câncer de pênis			
Oncogenes		Genes supressores tumorais	
Categoria	Proto-oncogene	Categoria	Proto-oncogene
Ligação ao GTP	c-ras	Superfície celular	caderina E
Ativadores da transcrição	myc N-myc L-myc	Núcleo	p53 p21 p16
Reguladores do ciclo celular	ciclina D CDK4	Inibidores da apoptose	BAX bcl-2

Análises moleculares de carcinomas associados ao HPV e a verrugas genitais benignas revelam diferenças. Em verrugas benignas e em lesões pré-neoplásicas, o genoma do HPV é mantido em forma epissômica, ao passo que nas neoplasias, o DNA viral geralmente se integra ao genoma da célula hospedeira. O sítio no qual o DNA viral é interrompido nesse processo de integração situa-se quase sempre dentro da estrutura de leitura abertura E1/E2 do genoma viral. Como a região E2 do DNA viral normalmente reprime a transcrição dos genes virais iniciais E6 e E7, sua interrupção provoca superexpressão das proteínas E6 e E7 do HPV-16 e do HPV-18.

Proteína E7 liga-se à forma subfosforilada da proteína supressora tumoral pRb e desloca os fatores de transcrição E2F. A E6 liga-se ao produto gênico p53, facilitando sua degradação. A afinidade dessas proteínas virais pelos produtos dos genes supressores tumorais difere, dependendo do potencial oncogênico do HPV. Logo, proteínas derivadas do HPV de alto risco (tipos 16, 18 e 31) ligam-se à pRb e ao p53 com alta afinidade. Dessa forma, proteínas virais E6 e E7 do HPV de alto risco incapacitam duas proteínas supressoras tumorais importantes que regulam o ciclo celular e, como resultado, tem-se distúrbio da via p16<sup>INK4a</sup>/ciclina D/Rb e p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53. Eventos epigenéticos subsequentes ocorridos na célula hospedeira na neoplasia peniana ainda não foram bem-estudados, mas podem incluir aquelas observadas na carcinogênese do colo uterino mediada pelo HPV, como metilação do promotor da CADM-1, proteína de superfície celular semelhante à imunoglobulina (Ig) envolvida na adesão célula-célula e alterações na composição do complexo AP-1, fator de transcrição composto de diferentes proteínas (c-Jun, c-Fos ou Fra-1) em complexos homo ou heterodímeros.

## CÂNCER DE RIM

Etiologia do carcinoma de células renais (CCR) é desconhecida, mas estudos observaram casos em que exposição a agentes químicos (nitrosaminas e cádmio), vírus (LTV) e tabaco poderiam estar envolvidos.

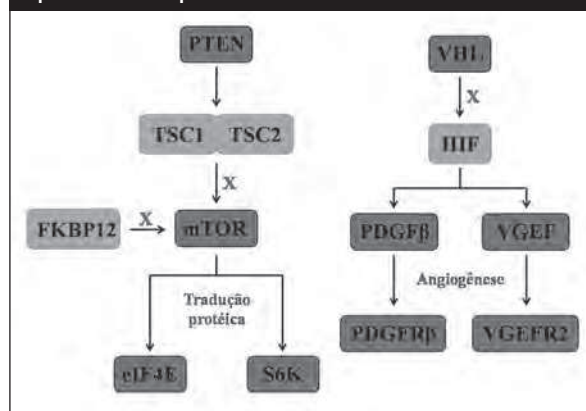
Fatores hereditários certamente explicam alguns casos de adenocarcinoma renal. Na síndrome de von Hippel-Lindau ocorre perda do gene supressor do tumor (gene VHL), localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p25). Em 40% desses casos de perda do gene VHL surge o carcinoma de células claras (CCC), que em geral é múltiplo e bilateral (Tabela 2 e Figura 4). Perda do

VHL também está presente em até 50% dos casos de CCR esporádicos.

Diversas funções foram propostas ao gene VHL,

Tabela 2 – Alterações encontradas nos carcinomas de células renais		
Tipo histológico	Incidência	Achados
Células claras	70 a 80%	Mutação p53 Expressão do c-erbB1 Deleção do cromossomo 3p Perda do gene VHL
Papilar	10 a 15%	Trissomia do cromossomo 7 e 17 Perda do cromossomo Y Ativação do proto-oncogene MET
Cromóforo	4 a 5%	Monossomia dos cromossomos 1, 2, 6, 10, 13, 17 Mutação do p53
Medular	0,4 a 2,6%	Perda do cromossomo Y Alteração dos cromossomos 6p8p, 13q, 21q Monossomia dos cromossomos 18 e 21 Expressão do c-erbB1

Figura 4 – Vias moleculares no câncer renal. Na figura acima, 'proteica' e não 'proteica'.



dentre elas de regulação do fator induzido por hipóxia (HIF), que tem grande envolvimento na indução de genes com importante papel na angiogênese (VEGF), no metabolismo energético, no crescimento celular, em metástases e na apoptose e é responsável por fazer com que os tumores se adequem a um microambiente hipóxico.

Tumores papilares tipo 1 correlacionam-se com

mutações no protooncogene MET, localizado no cromossomo 7q, que codifica uma proteína transmembrana (c-MET) que interage com fatores de crescimento. Tumores papilares tipo 2 têm relação com mutações no gene fumarato hidratase, provocando ativação do HIF. Mutação ou perda do gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 17 induz a síndrome de Birt-Rogg-Dube, caracterizada por fibrofolículos cutâneos, leiomiomas uterinos, cistos pulmonares e pneumotórax espontâneo, além de tumores renais, muitas vezes múltiplos e bilaterais.

Outra via que parece estar desregulada na gênese do CCR é a do mTOR, que tem papel crítico na progressão celular da fase G1 à fase S por meio de estímulo de síntese proteica por fosforilação de reguladores translacionais, como a quinase S6.

## CÂNCER DE BEXIGA

Diversos genes e diversas alterações genéticas foram relacionados ao desenvolvimento e à progressão do câncer de célula transicionais (CCT), como mutações nos genes HRAS, FGFR3, MDM2 e outros.

Genes relacionados às proteínas controladoras da fase G1 (p16, p14<sup>ARF</sup>, p53 e ciclina D) também estão alterados no câncer de bexiga. Além disso, diversas regiões com expressão de genes supressores de tumores e com áreas de deleção foram identificadas por meio de análise por perda de heterozigidade e de hibridização genômica. Uma potencial via de desenvolvimento do câncer de bexiga e a perda do controle da fase G1 são mutações, e por inativações de genes controladores desse fenômeno. Duas vias, da p53 e da proteína relacionado ao retinoblastoma (pRb), estão relacionadas a esse processo, regulando a lesão ao DNA e o controle da sinalização mitogênica.

Outra via importante relacionada é a da INK<sup>4A</sup>/ARF, com suas duas proteínas, p16 e p14<sup>ARF</sup>. Numa via, a p16 inibe a atividade da ciclina dependente de quinase (CDK), que age fosforilando a pRB. Essa fosforilação provoca transcrição do fator E2F1, que leva à transcrição de genes necessários para progressão à fase S. Na segunda via, a p14<sup>ARF</sup> causa super-regulação nos níveis da p53, que induz parada do ciclo celular na fase G1 ou ainda apoptose por meio da p21/WAF, inibidor da CDK. Estabilização da p53 via p14<sup>ARF</sup> está relacionada à MDM2, uma proteína que promove degradação da mesma via ubiquitinação.

**Legenda – Siglas utilizadas no texto, em ordem de aparecimento.**

RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
RA	Receptor androgênico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
IGF	Fator de crescimento insulina-símile
KGF	Fator de crescimento do queratinócito
PSA	Antígeno prostático específico
AP-1	Ativador da proteína 1
AMPC	Adenosina monofosfato cíclica
Her-2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
AKT	Família de proteínas, também chamadas de proteína quinase B
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
PI-3K	Fosfoinositide 3-quinase
GSK3-β	Glicogênio quinase sintetase 3 β
Bcl2	Célula de linfoma B tipo 2
HPV	Papiloma-vírus humano
Rb	Retinoblastoma
CADM	Molécula de adesão celular
CCR	Carcinoma de células renais
LTV	Vírus da laringotraqueíte
VHL	von Hippel-Lindau
CCC	Carcinoma de células claras
HIF	Fator induzido por hipóxia
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
mTOR	Alvo da rapamicina em mamífero
CCT	Carcinoma de células transicionais
FGFR	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto
CDK	Ciclina dependente de quinase

## LEITURA RECOMENDADA

- Di Lorenzo G, Autorino R, De Laurentiis M, Cindolo L, D'Armiento M, Bianco AR, et al. HER-2/neu receptor in prostate cancer development and progression to androgen independence. *Tumori*. 2004;90:163-70.
- Volek JS, Kraemer WJ, Bush JA, Incledon T, Boetes M. Testosterone and cortisol in relationship to dietary nutrients and resistance exercise. *J Appl Physiol*. 1997;82:49-54.
- Weissberger AJ, Ho KK. Activation of the somatotrophic axis by testosterone in adult males: evidence for the role of aromatization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1407-12.
- Wells A. Molecules in focus: EGFR receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:637-43.
- Kokontis JM, Liao S. Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam Horm*. 1999;55:219-307.
- Honeyman TW, Goodman HM, Fray JCS. The effects of growth hormone on blood pressure and renin secretion in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 1983;112:1613-7.
- Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3 induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687-9.
- Sharma M, Chuang WW, Sun Z. Phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3B inhibition and nuclear B-catenin accumulation. *J Biol Chem*. 2002;277:30935-41.
- Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: A challenge for the developing world. *Lancet Oncol*. 2004;5:240-7.
- Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MP, Berkhof J, Meijer CJ, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*. 2006;119:1078-81.