

Aspectos moleculares do câncer de bexiga

Molecular aspects of bladder cancer

Gelbert Luiz Chamon do Carmo Amorim¹, Denny Fabricio Magalhães Veloso¹, José Carlos Vieira¹,
Paulo Roberto Alves¹

RESUMO

Um dos mais importantes objetivos dos marcadores genéticos para o câncer será a possível identificação do indivíduo com maior risco de doença, permitindo melhor conduta e prognóstico. Nos casos dos tumores urológicos, vários tumores têm sido relacionados a vários tipos de alterações genéticas, com um grande número de genes envolvidos, que dificulta muito a terapia gênica que é o processo no qual, por meio de técnicas específicas, gene ou genes são manipulados em laboratório para provocar alterações moleculares capazes de bloquear o processo oncogênico. O presente artigo aborda essas questões enfatizando a importância do advento das novas técnicas de biologia molecular.

Descritores: Neoplasias da bexiga urinária/genética; Bexiga urinária/ patologia

ABSTRACT

One of the most important objectives of genetic markers of cancer will be the possible identification of individuals at greatest risk in order to allow better management and prognosis. Many urological tumors were associated to various types of gene alterations with a great number of genes involved in the process, hindering gene therapy. This treatment uses specific techniques and one or several genes are manipulated in the laboratory in order to induce molecular alterations that may block the oncogenic process. The article addresses these issues emphasizing the importance of the new molecular biology techniques.

Keywords: Urinary bladder neoplasms/genetics; Urinary bladder/ pathology

INTRODUÇÃO

A importância da genética cresceu muita nos últimos anos, e seu estudo se tornou necessário para compreensão de muitas doenças⁽¹⁾. Os processos biológicos têm um certo grau de influencia genética, a investigação dos mecanismos moleculares que os determinam tornou-se objeto de inúmeras abordagens, possíveis devido ao de-

envolvimento de tecnologias que permitem o estudo do DNA.

Apesar do progresso das técnicas cirúrgicas, o tratamento efetivo ainda necessita de compreensão dos fenômenos determinantes do câncer ainda não desvendados.

Fatores genéticos e ambientais são causas das lesões do genoma que levam ao câncer, uma doença genética no nível somático que resulta de mutações seqüenciais em genes responsáveis pela proliferação, morte e diferenciação celular, resultando em instabilidade genômica.

Assim, a célula na qual se originou a cascata de mutações se multiplica, evoluindo em sublinhagens com graus variados de alterações e malignidade, gerando heterogeneidade tumoral.

Alguns dos mecanismos que afetam a seqüência normal do ciclo celular envolvem mutações em dois grupos de genes, os oncogenes que estão relacionados à indução da divisão celular e os genes supressores de tumor que atuam sobre os oncogenes no controle da proliferação.

Mutações em genes supressores podem levar a transformação maligna das células quando a função dos alelos é perdida, causando uma divisão celular descontrolada, diferenciação anormal e apoptose deficiente.

O gene mais frequentemente mutado em diferentes tipos de câncer no homem, inclusive o de bexiga, é a proteína p53⁽²⁾.

Deve-se considerar a questão da instabilidade cromossômica nas células tumorais, que sugere que o câncer poderia ser resultado de um desequilíbrio no número de cromossomos, logo, na quantidade de informação genética funcional da célula.

Existe ainda a acentuada variação entre indivíduos na susceptibilidade a carcinógenos, do mesmo modo, diversos fatores determinados geneticamente parecem

Estudo realizado na Santa Casa de Belo Horizonte (MG), Brasil.

¹Serviço de Urologia da Santa Casa de Belo Horizonte (MG), Brasil.

Correspondência para: Gelbert Luiz Chamon do Carmo Amorim – Rua: Manaus, 645 – Santa Efigênia – CEP: 30150-350 – Belo Horizonte – Minas Gerais (MG), Brasil. Tel.: (31) 3774-7500 - e-mail: gelbertchamon@hotmail.com

Data de submissão: 13/01/2010 – Data de aceite: 20/12/2010

se relacionar ao risco de câncer, sem uma correlação com carcinógenos. Fatores exógenos, como, estilo de vida, podem determinar o aporte de vitaminas, antioxidantes e compostos que modulam o risco de desenvolver neoplasias.

Um dos mais importantes objetivos dos marcadores genéticos para o câncer será a possível identificação do indivíduo com maior risco de doença, permitindo melhor conduta e prognóstico.

Nos casos dos tumores urológicos, vários tumores têm sido relacionados a vários tipos de alterações genéticas, com um grande número de genes envolvidos, que dificulta muito a terapia gênica.

A terapia gênica é o processo no qual, por meio de técnicas específicas, gene ou genes são manipulados em laboratório para provocar alterações moleculares capazes de bloquear o processo oncogênico.

CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga, principalmente o carcinoma de células transicionais (CCT), representa o quarto tumor mais comum em homens nos EUA.

Este câncer apresenta um curso clínico e um prognóstico variável, sendo que 70% se apresenta como tumor superficial ao diagnóstico, porém, mais de 60% apresentarão recorrência após ressecção endoscópica, e o que mais preocupa, em 30% esta ocorrerá em grau e/ou estágio mais avançado, mostrando progressão da doença. Cerca de 10% a 5% dos pacientes com tumores inicialmente superficiais desenvolverão doença invasiva, com envolvimento da musculatura da bexiga⁽³⁻⁷⁾.

Dentre os pacientes que se apresenta com doença invasiva localizada e tratada de maneira radical, 50% desenvolverão doença metastática. Na tentativa de prever quais tumores superficiais que iriam tornar-se invasivos e quais invasivos teriam tendência a metastatizar tem sido estudados vários marcadores prognósticos.

O Gene p53.

Com o desenvolvimento da análise de DNA, através de técnicas de clonagem, tem sido descoberto um grande arsenal de genes envolvidos com o desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer.

Particular importância tem sido dada a mutações no gen supressor p53, considerado o defeito genético mais estudado em câncer de bexiga⁽²⁾.

Este gene, localizado no braço curto do cromossomo 17, parece atuar na codificação de uma proteína nuclear de 53kDa, a qual exerce efeito na regulação transcricional do ciclo celular. As mutações do p53 causam aumento na expressão e meia-vida dessa proteína não funcionando com consequente perda da sua atividade

supressora, fazendo com que esta passe agora a ser detectada por meio de imunohistoquímica.

A detecção do acúmulo nuclear da proteína p53 por imunohistoquímica está fortemente associada com as mutações do p53, porém a ausência de imunoreatividade não exclui essa alteração genética. A reatividade dessa proteína tem sido demonstrada em 50% dos pacientes com câncer de bexiga (CCT), prevalecendo principalmente naqueles de alto grau e estágio avançado. Tem sido demonstrada também maior ocorrência de mutações no p53 em tumores invasivos quando comparados a superficiais. Fujimoto et al.⁽⁸⁾ encontraram p53 mutante em 50% dos pacientes com tumores invasivos e apenas 7,6% em tumores superficiais.

Assim vários autores estudaram as alterações no p53, observando relação direta entre a ocorrência de alterações genéticas com as chances de progressão e óbito pela doença.

A observação de mutações em tumores superficiais tem sido relatada em 22% a 64% dos pacientes, sendo notada relação direta entre probabilidade de recorrência e diminuição de sobrevida. Hudson et al. encontraram 71% de progressão para doença invasiva em pacientes p53 positivos comparado a 22% nos pacientes em que a proteína era indetectável⁽⁹⁾.

Outro fato importante é o da redução de sobrevida relacionada à doença em pacientes tratados por meio de cistectomia radical por doença localizada e que apresentam expressão aumentada da p53, mostrando ser um importante indicador, independente do grau e estágio da doença.

Sabe-se que geralmente recorrências superficiais ocorrem com tumores diplóides e p53 mutantes negativos e, tumores com metástase são aneuploides e p53 positivos, porém, ambos sem vantagens prognósticas sobre os índices de proliferação celular.

Em se tratando do carcinoma *in situ*, notou-se forte relação entre aumento da expressão do p53 com as chances de progressão e queda de sobrevida doença específica. Nessa análise, 48% apresentaram expressão aumentada de p53, sendo que destes, 86,7% desenvolveram progressão.

Mais recentemente, alguns autores demonstraram que a positividade do p53 pode ser convertida após a imunoterapia com BCG, portanto, também se demonstrou que a chance de progressão da doença seria maior à medida que ocorre falha na terapia de BCG. Nos pacientes P53 negativo aproximadamente 20% apresentaram progressão da doença.

De maneira geral, podemos observar que a expressão do p53 está diretamente relacionada com o prognóstico do paciente com câncer de bexiga (CCT), onde aqueles com doença superficial e expressão aumentada de p53 devem ser acompanhados de forma cuidadosa.

Os pacientes com câncer *in situ* tratados com BCG, e que apresentem recidiva e tem *p53* positivo, devem ser considerados candidatos a cistectomia radical.

Aqueles submetidos a cistectomia radical e possuem *p53* positivo devem ser considerados como de risco aumentado para progressão, com um controle rigoroso.

É importante citar que a expressão imuno-histoquímica do gene *p53* não altera a importância de fatores prognósticos tradicionais do câncer de bexiga, principalmente o grau histológico do câncer. Também, ainda existem dados conflitantes na literatura principalmente quando se analisa o papel da expressão do gene *p53* como fator independente no prognóstico de carcinomas vesicais.

Uma possível explicação para os resultados conflitantes a respeito deste gene seria a dificuldade de padronização das diferentes técnicas de detecção das mutações do gene *p53*, já que nenhuma delas tem sensibilidade de 100%.

Outra explicação para as controvérsias seria a diferente expressão dos vários anticorpos, que comparados ao anticorpo pab 1801, apresentam resultados inferiores na detecção de mutações em tecidos fixados em formalina. Por outro lado, o grau de concordância do pab 1801 em material a fresco e parafinado esta em torno de 92 a 96%. Contudo, ao compararmos 3 anticorpos: CM1, Pab 1801 e D07, em exames a fresco e em parafina, observou-se que o principal fator de discordância e a expressão variável da proteína *p53* dentro da mesma amostra tumoral, independente do anticorpo utilizado.

Necessita-se, portanto, compreender melhor a relação entre os vários agentes atuantes na biologia tumoral, aprimorar e padronizar técnicas de detecção para uma conclusão sobre o papel clínico da expressão do gene *p53* ^(10,11).

INSTABILIDADE GENÉTICA

A instabilidade genômica, com particular referência ao carcinoma de células transicionais de bexiga, são detectadas em 6 de cada 200 casos de CCT, ocorre apresentando as duas instabilidades existentes.

A instabilidade genômica em câncer de bexiga em dois tipos: MSI (instabilidade do micro satélite) e CIN (instabilidade microssoma).

MSI se relaciona a defeitos no MMR (*mismatch repair*) e CIN se refere a anormalidades na segregação cromossômica.

Quando analisamos câncer de bexiga, 50% se relaciona a CIN e apresenta prognóstico pior e 9% se caracteriza como MSI que se caracteriza com melhor prognóstico, observa-se também maior ocorrência de câncer de bexiga associado a MSI em pacientes jovens⁽¹²⁻¹⁷⁾.

GSTM1 E CYP2D6

A susceptibilidade de ocorrência do câncer de bexiga depende da correlação entre fatores genéticos e o meio ambiente. Recentes pesquisas buscaram relações de que a susceptibilidade ao câncer de bexiga pode variar de acordo com o polimorfismo dos genes CYP2D6 e GSTM1⁽¹⁸⁾.

O gene CYP2D6 se relaciona ao citocromo P450 cujos substratos incluem aminas aromáticas e nitrosaminas do tabaco.

O GSTM1 se relaciona a enzimas com muitas funções, entre elas desintoxicação do ciclo aromático de hidrocarbonetos do cigarro e aminas aromáticas.

Estudos realizados em pacientes que apresentam câncer de bexiga e analisaram a ocorrência de ambos os genes, evidenciaram que o gene GSTM1 se mostra mais associado à ocorrência de câncer de bexiga, principalmente naqueles pacientes com tumores superficiais e a associação é mais forte em indivíduos tabagistas.

Já o gene CYP2D6 não apresentou a mesma significância de associação.

Amplificação / super expressão de um gene mitótico no câncer de bexiga

A instabilidade genômica tem sido sugerida como causa da transformação maligna e progressão de câncer, estudos indicam que muitas instabilidades genéticas se associam a mecanismos distintos que levam ao câncer humano.

A forma de instabilidade genômica mais bem caracterizada é a inativação do DNA reparador de genes, porém, essa forma de instabilidade pode ser averiguada em uma pequena proporção dos tumores.

O gene STK15/BTAK/AuroraA se associa com aneuploidia e a transformação quando super expressado em células, quando isto ocorre se ativa um oncogen que envolve a ampliação do centrômero e resulta em miscigenação de cromossomos. Esta aneuploidia quando somado a fatores clínico prognóstico se associa ao tumor de bexiga.

Apesar da elevada expressão do STK15 parecer ser uma frequente em tumores de bexiga, aproximadamente 30% da aneuploidia em tumores de bexiga agressivos não evidencia o STK15 com super expressão. Isto sugere que, em uma fração dos tumores de bexiga outros genes estão associados a aneuploidia. De fato, duas descobertas de membros da família Aurora quinase, o Aurora-B e Aurora-C tem sido relatada como responsáveis por aumento de expressão de alguns cânceres humanos.

É importante notar que, o STK15 está localizado no cromossomo 20q13 e foi identificada pela procura de seqüências com super expressão ao longo do cromos-

somo 20. A região de 20q é tipicamente amplificada em câncer de bexiga de alto grau.

Portanto, ao se analisar a ocorrência de instabilidade genômica, principalmente em se tratando de aneuploidia com a ocorrência de tumores de bexiga, observa-se que estão fortemente relacionados.

Tumores com um mínimo desvio de cópia do cromossomo são clinicamente menos agressivos que aqueles com maior desvio de cópias dos cromossomos.

Recentes pesquisas mostraram que o STK15/BTAK/AuroraA está implicada na regulação do centrômero e está ligada a frequente amplificação e super expressão de tumores humanos, e, portanto seria um componente regulador de segregação do cromossomo e pode causar aneuploidia e transformação.

E, portanto, comprovando que o STK15 se associa ao aumento da expressão de mitoses e aneuploidia e conseqüentemente a maior agressividade do câncer de bexiga⁽¹⁹⁾.

Perda de alelo do cromossomo 3 e alterações microsatélites e câncer de bexiga

Estudos indicam que deleções no cromossomo 3, principalmente 3 discretas nas regiões 3p são identificadas no câncer de bexiga, sugerindo que nestas regiões estão o supressor dos genes. Também a detecção de perda de alelos nestas regiões estariam associadas a uma maior gravidade do tumor de bexiga, sugerindo sua relação com a progressão do câncer.

Estudos indicam que esta ocorrência de perda de alelos poderia ocorrer nos cromossomos 17p13, 3p25-26,9q32-33. A maior ocorrência de deleção de alelos ocorre no cromossomo 9p e 9q, mapas moleculares evidenciam vários genes supressores no cromossomo 9 e a maior probabilidade de perda do cromossomo 9 seria um evento precoce na formação do câncer. As outras alterações genéticas que frequentemente ocorrem estão nos cromossomos 1, 8, 16,14 e 21.

Portanto, a perda de alelos em múltiplos locais do genoma ocorre com frequência no câncer de bexiga.

Quando analisamos pacientes com carcinoma *in situ*, podemos observar que isoladamente o carcinoma *in situ* contem células com perda não específica do cromossomo 9, porém, neoplasia *in situ* com carcinoma sincrônico evidencia lesões com perda no cromossomo 9. As mutações no *p53* precedem as perdas de alelos no cromossomo 9, e o 9p21 no carcinoma *in situ* e um precursor de invasibilidade do câncer de bexiga, ao passo que carcinomas não invasivos onde o cromossomo 9 com as perdas (9p11-9q12) são precocemente e frequentemente combinados a deleções homozigóticas do 9p21⁽²⁰⁾.

Hiper amplificação do centrômero como fator preditivo de progressão e recorrência do câncer de bexiga.

Várias evidências sugerem que a super expressão do STK15/BTAK/AuroraA, gene que está localizado no 20q13, induz a aneuploidia, instabilidade microssomal, e amplificação do centrômero (CH). Os dados sugerem que existe uma forte associação entre CH e a super expressão do Aurora-A. Um grande número de cópias do 20q13 estariam associados a varias frações dos cromossomos 7,9 e 17, bem como as CH. Existem suspeitas de que metades dos casos de CH seriam causadas pela amplificação ou ganho do gene STK15/BTAK/AuroraA.

Estudos recentes evidenciam que a hiper amplificação do centrômero (CH) cursa com uma instabilidade cromossômica durante o desenvolvimento do câncer de bexiga o que confere aos tumores elevadas características de malignidade, portanto, seria um independente e importante fator de prognóstico para recorrência do câncer, porém quando se analisa a progressão do câncer de bexiga ainda não se pode concluir que a CH poderia influenciar a sua ocorrência.

CONCLUSÃO

Com o advento das novas técnicas de biologia molecular, as alterações celulares ocorridas na carcinogênese puderam ser estudadas mais profundamente. Atualmente, como conceito geral, admite-se que o processo carcinogênico é decorrente de um caminho complexo que envolve a combinação de inativação de genes inibidores tumorais e ativação de genes promotores tumorais (oncogenes). Para que ocorra a formação de um tumor, várias etapas devem ser alcançadas, começando pela inibição tumoral, passando pela proliferação, perda da inibição por contato invasão e metástase da célula cancerígena.

Um acúmulo de mutações em genes essenciais podem transformar uma célula normal em uma célula cancerígena. Esta célula transformada então cresce de forma desordenada até formar o tumor com mutações adicionais ocorrendo durante este processo. Quando do diagnóstico do câncer, o mesmo trata-se de uma mistura de células de câncer com sub clones, que torna difícil estabelecer a ordem de ocorrência de alterações genéticas.

O câncer de bexiga, no entanto, permite um estudo diferente e único das mutações, pois, os diferentes sub clones do tumor crescem em sítios separados e permitem estudos independentes.

Várias pesquisas foram e são realizadas na tentativa de relacionar as características biológicas do câncer de bexiga, sua ocorrência, sua histologia e sua gravidade

com os diferentes tipos de mutações e instabilidade cromossômicas.

Deve-se ter em mente que, a biologia molecular e a genética estão a caminho de novos conhecimentos sobre fisiopatologia molecular tumoral, e que a terapia gênica deixou de ser ficção para se tornar uma esperança real.

REFERÊNCIAS

- Gattás N. Terapia gênica: o urologista de olho no futuro: Sinopse de Urologia [Internet] 1998 [citado 2010 Jan 20]; 2(5). Disponível em: <http://www.uronline.unifesp.br/uronline/ed1098/terapia.htm>
- Almeida SHM, Derrose D, Freitas MA, Liboni M, Dinardi R, Moreira H. Marcadores em Câncer de bexiga - importância da expressão do p53 como indicador prognóstico. *Braz J Urol.* 2000;26:378-384.
- Yoshiaki Y, Hideyasu M, Tomoko F, Atsunori O, Saturo Y, Masaru O, Higeto K, Kohsuke S, Katsusuke N. Centrosome hyper amplification predicts progression and tumor recurrence in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6449-55.
- Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, et al. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):2752-8.
- van Tilborg AA, de Vries A, de Bont M, Groenfeld LE, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder. *Hum Mol Genet.* 2000;9(20):2973-80.
- Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res.* 2003; 63(9):2216-22.
- Cafe LE, Arruda H. Novos marcadores no câncer de bexiga. *Sinopse Urol.* 1999;1(1): 3-4.
- Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1992;52(6):1393-8.
- Hudson MA, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Vollmer RT. Use of p53, MIB-1, EGFR, c-erb B-2, bcl-2 as prognostic markers in bladder cancer patients. *Proc Am Urol Assoc.* 1996; 155(Suppl A): 615A.
- Li M, Zhang ZF, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 3 allelic losses and micro satellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol.* 2006;149(1):229-35.
- Halachmi S, Madeb R, Kravtsov A, Moskovitz B, Halachmi N, Nativ O. Bladder cancer-genetic overview. *Med Sci Monit.* 2001;7(1):164-8.
- Tury J, Matuszewski M, Schlichtholz B. Genomic instability analysis of urine sediment versus tumor tissue in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Oncol Rep.* 2006;15(1):259-65.
- Hopman AH, Kamps MA, Speel EJ, Schapers RF, Sauter G, Ramaekers FC. Identification of chromosome 9 alterations and p53 accumulation in isolated carcinoma in situ of the urinary bladder versus carcinoma in situ associated with carcinoma. *Am J Pathol.* 2002;161(4):1119-25.
- Cheng L, Gu J, Ulbright TM, MacLennan GT, Sweeney CJ, Zhang S, et al. Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor. *Cancer* 2002;94(1):104-10.
- Matsuda H, Uejima S, Kurita T. [Microsatellite instability in renal cell carcinoma and bladder tumors]. *Hinyokika Kyo.* 1996;42(1):27-31. Japanese
- Catto JW, Meuth M, Hamdy FC. Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int.* 2004;93(1):19-24.
- Erill N, Colomer A, Verdú M, Román R, Condom E, Hannaoui N, Banús JM, Cordon-Cardo C, Puig X. Genetic and immunophenotype analyses of TP53 in bladder cancer: TP53 alterations are associated with tumor progression. *Diagn Mol Pathol.* 2004;13(4):217-23.
- Figueiredo AJ, Coimbra HB, Sobral FT, Martins J, Linhares-Furtado AJ, Regateiro FJ. Genetic polymorphisms of genes GSTM1 and CYP2D6 and bladder cancer. *Braz J Urol.* 2000;126(3): 250-5.
- Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002 94(17):1320-9.
- Li M, Zhang ZF, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Am J Pathol.* 1996;149(1):229-35.