

Diogo Afonso Veríssimo Marques Lagoa

# Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Alcino Lopes Jorge Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diogo Afonso Veríssimo Marques Lagoa

# Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Alcino Lopes Jorge Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Declaração de Integridade**

Eu, Diogo Afonso Veríssimo Marques Lagoa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008011453, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de julho de 2016

---

(Diogo Afonso Veríssimo Marques Lagoa)

**O Orientador da Monografia**

---

(Professor Doutor Alcino Lopes Jorge Leitão)

**O Aluno**

---

(Diogo Afonso Veríssimo Marques Lagoa)

## Agradecimentos

Concluída esta derradeira etapa da vida que foi a minha formação académica, não poderia deixar passar a oportunidade de deixar alguns agradecimentos pessoais:

Aos meus pais e irmão, pelos sacrifícios e apoio constante ao longe todo este percurso.

À minha restante família, pela presença e acompanhamento constante, mesmo quando a distância o torna mais difícil.

À Inês, por todos os momentos que partilhamos durante este percurso.

Aos meus amigos, os que trazia e os muitos novos que fiz, por todas as vivências que partilhámos ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Alcino Leitão, por todo apoio, orientação e disponibilidade.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo contributo que teve na minha formação profissional e pessoal.

Por último, a Coimbra, por todos os bons momentos que me proporcionou.

# Índice

## Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

## Abstract

## Resumo

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Superfamília Aldo-ceto Reductase</b> .....	3
2.1. Nomenclatura.....	3
2.2. Aldo-Ceto Reductases Humanas.....	4
<b>3. Aldo-Ceto Reductases e o Seu Envolvimento no Metabolismo Esteróide e Prostaglandínico Humano</b> .....	8
3.1. Aldo-Ceto Reductases nas Vias Metabólicas Androgénicas .....	9
3.2. Aldo-Ceto Reductases nas Vias Metabólicas Estrogénicas e Progestagénicas .....	11
3.3. Aldo-Ceto Reductases nas Vias Metabólicas Prostaglandínicas .....	11
3.4. Aldo-Ceto Reductases no Controlo de Recetores Esteróides .....	13
<b>4. Aldo-Ceto Reductases IC e o Seu Envolvimento no Cancro da Próstata e da Mama</b> .....	14
4.1. Aldo-Ceto Reductases IC no Cancro da Próstata .....	14
4.2. Aldo-Ceto Reductases IC no Cancro da Mama .....	16
<b>5. Considerações Finais</b> .....	19
<b>6. Bibliografia</b> .....	21

## Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

**AKR** – Aldo-ceto Reductases (*Aldo-keto Reductases*)

**SDR** – Desidrogenase/reductase de cadeia curta (*Short-chain Dehydrogenases/Reductases*)

**HGNC** – *Hugo Gene Nomenclature Committee*

**CYP450** – Citocromo P450

**5 $\alpha$ -DHT** – 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona

**3 $\alpha$ -androstenediol** – 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol

**Androstenediona** –  $\Delta$ 4-androstene-3,17-diona

**PG** – Prostaglandina

**5 $\alpha$ -androstanodiona** – 5 $\alpha$ -androstane-3,17-diona

**UGT** – UDP-glicuronosil Transferase

**COMT** – Catecol-O-metil Transferase

**AR** – Recetor Androgénio (*androgen receptor*)

**DHEA** – Desidroepiandrosterona

**HSD** – Hidroxiesteróide Reductase

**5 $\alpha$ -DHP** – 5 $\alpha$ -pregnano-3,20-diona (5 $\alpha$ -dihidroxiprogesterona)

**Alopregnanolona** – 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnano-20-ona

**ER** – Recetor de Estrogénio (*estrogen receptor*)

**HBP** – Hiperplasia Benigna da Próstata

**PR** – Recetor da Progesterona (*progesterone receptor*)

**GABA** – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

**COX** – Ciclo-oxigenase

**MAPK** – Proteína-quinases Activada por Mitogénios (*Mitogen Activated Protein Kinases*)

**PPAR  $\gamma$**  – Recetor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma  $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* )

**NF $\kappa$ B** – Factor Nuclear  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)

**15-PGJ<sub>2</sub>** – 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>

**GnRH** – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

**CPRC** – Cancro da Próstata Resistente à Castração

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**HER2** – Fator de Crescimento Epidérmico tipo 2

## Abstract

The aldo-keto reductases (AKR) are an enzymatic superfamily of oxidoreductases that catalyze NADPH-dependent reductions and that exhibit a broad specificity to carbonylic substrates such as carbohydrates, keto-steroids, keto-prostaglandins, xenobiotics, among others. Some human isoforms are deeply involved in the steroid metabolic pathways, having an active and relevant role in the biosynthesis and inactivation of hormones such as testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT), oestradiol and progesterone. They can additionally mediate the biosynthesis of some prostaglandins.

Breast and prostate cancer are hormone-dependent malignancies with huge prevalence and high mortality. As the name suggests, they are highly dependent on oestrogen and androgen supply, respectively, to stimulate their growth and metastization. The AKR, because of its involvement in these hormone's metabolic pathway, may be implicated in the pathogenesis of these diseases and, therefore, be an attractive therapeutical target to be further studied in the search of new therapies to these cancers.

**Keywords:** Aldo-keto Reductases; Testosterone; 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone; Oestradiol; Progesterone; Breast Cancer; Prostate Cancer.

## Resumo

As Aldo-ceto Reductases (AKR) são uma superfamília enzimática de oxidoreductases que catalisam reduções NADPH-dependentes e que apresentam especificidade para os mais diversos substratos carbonílicos como hidratos de carbono, ceto-esteróides, ceto-prostaglandinas, xenobióticos, entre outros. Algumas isoformas humanas estão profundamente envolvidas nas vias metabólicas esteróides, tendo um papel ativo e relevante na biossíntese e inativação de hormonas como a testosterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT), estradiol e progesterona. Têm também a capacidade de mediar a biossíntese de algumas prostaglandinas.

O cancro da mama e da próstata são doenças hormono-dependentes com enorme prevalência e elevada taxa de mortalidade. Como o nome sugere, são altamente dependentes de estrogénios e androgénios, respetivamente, para estimularem o seu desenvolvimento e metastização. As AKR, pelo seu envolvimento nas vias metabólicas destas hormonas, podem

estar implicadas na patogénese destas doenças e, por isso, ser um alvo terapêutico aliciante a ser explorado na busca de novas terapias para estes cancros.

**Palavras chave:** Aldo-Ceto Reductases; Testosterona;  $5\alpha$ -dihidrotestosterona; Estradiol; Progesterona; Cancro da Mama; Cancro da Próstata.

## Introdução

As aldo-ceto reductases (AKR) são uma superfamília de enzimas ubíquas na natureza, da qual fazem parte mais de 190 proteínas estrutural e funcionalmente relacionadas subdivididas em 16 famílias. Regra geral, são oxidoreductases proteicas monoméricas que catalisam reduções NADPH-dependentes e apresentam especificidade para os mais diversos substratos carbonílicos como hidratos de carbono, ceto-esteróides, ceto-prostaglandinas, xenobióticos, entre outros.

No ser humano estão identificadas e descritas 15 isoformas de enzimas desta superfamília. Estas estão envolvidas na biossíntese e metabolismo de diversos compostos endógenos e exógenos, tendo, algumas delas, um papel particularmente relevante na regulação de esteróides como estrogénio, progesterona, testosterona e 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, por vezes através de vias alternativas às cadeias metabólicas principais destas hormonas. Estão também envolvidas na biossíntese de algumas prostaglandinas, com possíveis implicações no seu equilíbrio fisiológico.

O cancro da mama e da próstata são doenças com enorme prevalência e taxa de mortalidade nos dias que correm. São tumores hormono-dependentes, requerendo a produção local de esteróides para se desenvolverem, proliferarem e metastizarem. As aldo-ceto reductases estão profundamente envolvidas em vias biossintéticas de esteróides e prostaglandinas essenciais para a estimulação e sinalização pró-proliferativa que permite o crescimento descontrolado destes. Assim, tem sido investigado nas últimas décadas o verdadeiro papel de algumas subfamílias das aldo-ceto reductases nos mecanismos que desencadeiam e regulam estas doenças.

É frequentemente abordada e descrita na literatura uma possível relação entre a sobre expressão de algumas enzimas desta superfamília e uma evolução negativa no prognóstico das doenças acima referidas, no entanto, nem todos os autores são consensuais quanto ao facto de, efetivamente, esta sobre regulação estar diretamente relacionada com as patologias. Esta divergência deve-se ao facto de autores diferentes, em condições teoricamente semelhantes e usando modelos similares de linhas celulares ou amostras de tecido tumoral, obterem resultados bastante diferentes, declarando uns valores muito aumentado de expressão de algumas destas enzimas e outros valores fisiológicos da mesma. Este caso aplica-se particularmente ao cancro da mama que, talvez por ser uma doença mais complexa e com muitas variantes, gere estas incongruências de resultados.

Não se pode ainda, portanto, concluir que haja uma estreita correlação entre a abundante expressão destas enzimas e o desenvolvimento dos referidos cancros ou, pelo menos, em todos eles e suas variantes. Pensa-se, contudo, que pode acontecer em subpopulações relevantes de doentes e que, nesses casos, a sua inibição pode ser extremamente benéfica e desejável para um desenrolar positivo do quadro clínico destes.

Pelo referido, as aldo-ceto reductases têm sido vastamente estudadas na tentativa de aferir o seu envolvimento no metabolismo de esteróides que alimentam doenças hormono-dependentes, principalmente cancro da mama e próstata, com vista ao desenvolvimento de um possível inibidor seletivo que, em monoterapia ou como complemento de outras, possa contribuir para a regressão e, eventualmente, cura destas neoplasias.

## 2. Super-família Aldo-Ceto Reductase

As aldo-ceto reductases (AKR) compreendem uma superfamília enzimática constituída por mais de 190 proteínas estruturalmente relacionadas, subdivididas em 16 famílias. São ubíquas na natureza, tendo sido identificados genes que as codificam em quase todos os *Filos* e podendo ser encontrados em seres tão distantes do ponto de vista genético como leveduras e o Homem.

Estas enzimas são, maioritariamente, oxidoreductases compostas por proteínas monoméricas solúveis, com peso molecular a variar entre 34 e 37 kDa, caracterizadas por apresentarem semelhante estrutura base e a mesma conformação: uma triose-fosfato isomerase, denominada barril-TIM ou barril- $(\beta/\alpha)_8$ , com *loops* e hélices na parte posterior deste que determinarão a sua especificidade para o substrato e lhes conferem identidade estrutural, permitindo assim a agregação em famílias. Todas as enzimas desta família identificadas e caracterizadas até á data apresentam um sítio ativo na porção C-terminal, uma téttrade conservada de Tirosina, Lisina, Histamina e Aspartato, e um domínio de ligação de um co-factor, NADPH ou NADH, dos quais são dependentes, tendo, no entanto, clara preferência pelo primeiro.

Em conjunto com as desidrogenases/reductases de cadeia curta (*short-chain dehydrogenases/reductases*, SDR), as AKR compõem as duas grandes superfamílias de enzimas responsáveis pela maioria das reduções de substratos carbonílicos em várias espécies e, embora apresentem conformações e estruturas diferentes, conservam o mesmo mecanismo catalítico. Ambas catalisam a redução de aldeídos e cetonas a álcoois primários e secundários, respetivamente, estando, portanto, envolvidas em várias reações catabólicas de fase I do metabolismo de vários compostos endógenos e/ou xenobióticos que contenham esses grupos funcionais. As AKR, em particular, têm a capacidade de reduzir substratos carbonílicos como hidratos de carbono, cetoesteróides, ceto-prostaglandinas, precursores biliares, quinonas, retinais, entre outros.

### 2.1. Nomenclatura

Em 1997, foi introduzida pelo *Hugo Genome Nomenclature Committee* (HGNC), uma nomenclatura para classificar os membros da superfamília AKR, baseada somente na semelhança da sequência genética deste e não na sua funcionalidade, além de usar uma simbologia menos intuitiva. Posteriormente, foi implementado um novo sistema de nomenclatura para a superfamília das AKR, sendo agora o mais aceite e constando

Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata inclusivamente do site da HGNC<sup>[1]</sup>, desenvolvido pela *Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania*, sob a tutela do Dr. Trevor M. Penning, Ph.D., professor e investigador com inúmeros artigos publicados sobre esta superfamília de enzimas<sup>[2]</sup>.

Neste sistema, a nomenclatura é similar à usada na classificação do citocromo P450 (CYP450). O formato geral apresenta sempre 'AKR' como prefixo, um número arábico que designa a família, uma letra maiúscula que indica a subfamília e outro número arábico que designa uma sequência única. Para pertencerem à mesma família, os seus membros têm de ter uma coincidência de 40% na sua sequência de aminoácidos; no caso das subfamílias, essa sequência tem de ser homóloga em 60%; no caso de esta ser superior a 97%, as proteínas são consideradas alelos a menos que apresentem diferentes atividades enzimáticas ou regiões 3' não traduzidas distintas<sup>[3]</sup>.

## 2.2. Aldo-Ceto Reductases Humanas

Até à data, foram identificadas mais de 15 isoformas de AKR expressas em humanos e em quase todos os tecidos<sup>[4]</sup>. Estão incluídas neste leque AKR das famílias 1, 6 e 7.

As AKR da família 1 são as mais relevantes e as que existem em maior número.

A AKR1A1 foi das primeiras a ser identificadas e, em muitos organismos onde é expressa, tem um papel importante na síntese de ácido ascórbico. No entanto, os humanos não sintetizam este composto, pelo que, nestes, a sua principal função está associada à conversão do mio-inositol a D-glucoronato por associação à mio-inositol oxigenase, enzima que catalisa a reação, no entanto, o mecanismo pelo qual atua não está completamente esclarecido. Funcionalmente, é uma aldose reductase e é expressa na maioria dos tecidos, apresentando maiores concentrações nos túbulos proximais renais.

As AKR1B humanas têm funções de aldose reductase, sendo também expressas em quase todos os tecidos do organismo. Esta subfamília é composta por duas enzimas, a 1B1 e 1B10. A primeira apresenta uma ampla especificidade para substratos, sendo uma das reações mais relevantes que catalisa a redução de pequenas quantidades de glucose a sorbitol. É uma AKR vastamente investigada pelo seu envolvimento no desenvolvimento de danos em diferentes tecidos associados a episódios hiperglicémicos. O aumento da expressão desta aldose reductase em tais situações, com consequente aumento da redução de glucose por mecanismos ainda não completamente esclarecidos mas que envolvem a regulação de múltiplas vias inflamatórias, pode mediar a agressão tecidular que leva ao desenvolvimento das

Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata

complicações secundárias diabéticas como retinopatia, nefropatia ou neuropatia. Já foi demonstrado que a inibição desta enzima interrompe as vias inflamatórias desencadeadas pelos elevados níveis de glucose ou outras citocinas pró-inflamatórias sobre expressas em situações de hiperglicemia, prevenindo ou atrasando a necrose tecidual, o que faz dela um alvo terapêutico muito aliciante dada a enorme prevalência de *Diabetes Mellitus* atualmente<sup>[4]</sup>. Com 71% de homologia na sequência de aminoácidos, a AKRIB10 é também uma aldose reductase que apresenta uma ampla especificidade para diversos substratos, similar à IBI, demonstrando, no entanto, algumas diferenças cinéticas em reações com alguns deles. Esta proteína, ao contrário da IBI, não é expressa ubiquamente no organismo, sendo-o maioritariamente no intestino delgado, cólon, fígado e timo. Encontra-se fortemente sobre expressa em carcinomas pulmonares e hepáticos, bem como em cancros uterinos e colorectais. Ensaios usando técnicas de silenciamento genético tendo como alvo o gene que codifica a enzima, demonstraram que a AKRIB10 tem um papel crucial na proliferação celular cancerígena, visto que, na ausência da sua expressão, observou-se inibição do crescimento e diminuição da taxa de formação de novas colónias de células anormais, atribuindo-se o papel mitogénico da proteína à depleção de ácido retinóico provocada pela sobre atividade desta, com consequente perda da capacidade de diferenciação celular e progressão cancerígena<sup>[3,4]</sup>.

As AKRIC, que incluem as AKRIC1, IC2, IC3, IC4, também designadas por hidroxisteróide desidrogenases pela sua capacidade de reduzir cetoesteróides a hidroxisteróides, partilham uma homologia genética de, pelo menos, 86% entre os seus membros, contudo, apresentam afinidades bem distintas para diferentes posições do núcleo ou cadeias laterais de diferentes esteróides, o que é explicado pelo facto das proteínas apresentarem estruturas cristalinas características. Os substratos naturais desta subfamília são esteróides e prostaglandinas. A AKRIC1 apresenta uma preferência para a redução de grupos 20-cetoesteróide, podendo mediar a redução da progesterona a 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, inativando-a. A AKRIC2 promove reduções na posição 3-cetoesteróide, tendo a capacidade de reduzir e inativar a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT) com formação de 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\alpha$ -androstenediol). A AKRIC3 mostra preferência pela redução de posições 17-cetoesteróide, exibindo, portanto, atividade 17 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase e tendo a capacidade de catalisar a conversão de  $\Delta^4$ -androstene-3,17-diona (Androstenediona) em testosterona, de 5 $\alpha$ -androstane-3,17-diona (5 $\alpha$ -androstenediona) em 5 $\alpha$ -DHT e da estrona em 17 $\beta$ -estradiol. Mais ainda, esta enzima pode converter prostaglandinas (PG) H<sub>2</sub> e D<sub>2</sub> em PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e em 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> $\alpha$  respetivamente. Por fim, a AKRIC4, apresenta uma preferência redutora de grupos 3-cetoesteróide a 3 $\alpha$ -hidroxisteróide.

Embora todas sejam encontradas no fígado, só a IC4 é predominantemente expressa nesse órgão, sendo considerada específica deste, enquanto a IC1, IC2 e IC3 são maioritariamente sintetizadas no tecido glandular mamário e prostático. A subfamília IC das AKR desempenha um papel crucial nas vias metabólicas das hormonas esteróides humanas, conjugados esteróides, prostaglandinas, esteróides sintéticos usados em terapêutica e biossíntese de neuroesteróides e ácidos biliares, papel esse que será aprofundado noutro capítulo.

A AKR1D1 é fulcral na síntese de ácidos biliares visto ser a única enzima que catalisa reduções  $5\beta$ -estereoespecíficas necessárias a este processo devido à sua capacidade para reduzir cetoesteróides aos correspondentes  $5\beta$ -dihidroesteróides, passíveis de serem posteriormente reduzidos pela AKR1C4 a ácido cólico e ácido quenodesoxicólico, os dois principais ácidos biliares produzidos pelo fígado. Mutações genéticas que se manifestem como uma deficiência na produção da referida proteína podem levar ao desenvolvimento de várias patologias como hepatite, falha renal ou colestase neonatal. Além destes substratos, a AKR1D1 apresenta também afinidade para outras hormonas esteróides como a testosterona, progesterona ou cortisol, sendo, todavia, a atividade catalítica baixa e redundante comparada com as AKR1C, sendo-lhe primariamente imputada uma função auxiliar na biossíntese de ácidos biliares.

A família 6 das AKR constitui um grupo de proteínas associadas aos canais iónicos de potássio dependentes de voltagem (Kv). São também designadas proteínas Kv $\beta$  pois estas proteínas, numa fase precoce da biogénese do canal, ligam-se à sua subunidade  $\alpha$ , que faz parte da constituição deste, e, por um processo cujos contornos não são totalmente claros, pensa-se que estas AKR facilitem a sua montagem e que estejam envolvidas, por um mecanismo NADPH-dependente, na sua abertura e fecho.

Por último, dois membros da família AKR7 subfamília A foram identificados e caracterizados em humanos: a AKR7A2 e 3AKR7A3, sendo também designadas de aflatoxina reductase. A primeira é ubiquamente expressa e encontra-se distribuída na maioria dos tecidos extra-hepáticos, tendo uma elevada afinidade e eficiência catalítica na redução do succinil semialdeído, um metabolito do neurotransmissor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), a  $\gamma$ -hidroxibutirato, podendo, assim, ter um potencial efeito neuromodulador. A segunda, ao contrário da 7A2, tem a sua distribuição restringida ao estômago, pâncreas, fígado e rins. É bastante eficiente na redução da aflatoxina B1-dialdeído, uma micotoxina que é produto derivado da aflatoxina B1 e que tem um elevado potencial carcinogénico, a outro produto que

Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata não apresenta esse risco. Pela sua confinada distribuição e atividade catalítica na conversão de produtos potencialmente tóxicos, como a aflatoxina referida anteriormente ou, em menor extensão, a acroleína e metilglioxal, a produtos não reativos, é atribuída a esta enzima um papel primariamente desintoxicante do organismo <sup>[4,6]</sup>.

Human aldo-keto reductases.	
Gene	Protein
AKR1A1	Aldehyde reductase
AKR1B1	Aldose reductase
AKR1B10	Aldose reductase
AKR1B15	Aldose reductase
AKR1C1	3 $\alpha$ (20 $\alpha$ )-hydroxysteroid dehydrogenase (20 $\alpha$ -HSD)
AKR1C2	Type 3 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase
AKR1C3	Type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; type 2 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase
AKR1C4	Type 1 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase
AKR1D1	Steroid 5 $\beta$ -reductase
AKR1E2	1,5-Anhydro-D-fructose reductase
AKR6A3	Potassium voltage gated channel, $\beta$ -subunit-1
AKR6A5	Potassium voltage gated channel, $\beta$ -subunit-2
AKR6A9	Potassium voltage gated channel, $\beta$ -subunit-3
AKR7A2	Aflatoxin aldehyde reductase; succinic semialdehyde reductase
AKR7A3	Aflatoxin aldehyde reductase

**Figura 1.** Aldo-ceto reductases humanas (Adaptado de <sup>[7]</sup>).

Role of human AKRs in health and disease.		
AKR	Reduction reaction	Associated disease
AKR1B1	Glucose $\rightarrow$ sorbitol (polyol pathway)	Diabetic complications: cataractogenesis; retinopathy; neuropathy; nephropathy
AKR1B10	All- <i>trans</i> -retinaldehyde $\rightarrow$ retinol	NSCLC hepatocarcinogenesis
AKR1C1	Progesterone $\rightarrow$ 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	Pre-term birth Endometriosis
AKR1C2	DHT $\rightarrow$ 3 $\alpha$ -androstenediol DHP $\rightarrow$ allopregnanolone	Androgen insufficiency Premenstrual syndrome
AKR1C3	$\Delta^4$ -Androstene-3,17-dione $\rightarrow$ testosterone 5 $\alpha$ -Androstane-3,17-dione $\rightarrow$ 5 $\alpha$ -DHT Estrone $\rightarrow$ 17 $\beta$ -estradiol PGH <sub>2</sub> $\rightarrow$ PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> PGD <sub>2</sub> $\rightarrow$ 11 $\beta$ -PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Advanced prostate cancer Breast cancer, Acute myeloid leukemia
AKR1D1	$\Delta^4$ -Cholesten-3-ones $\rightarrow$ 5 $\beta$ -cholestane-3-ones	Bile acid deficiency
AKR6A	NADPH dependent opening of voltage gated potassium channels	Aberrant redox regulation of Kev channels and cardiovascular disease
AKR7A2	Succinic semialdehyde $\rightarrow$ $\gamma$ -hydroxyl-butryate	Neuromodulator; succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency
AKR7A3	Aflatoxin dialdehyde $\rightarrow$ aflatoxin bis-alcohol	Hepatocarcinogenesis

**Figura 2.** Reações catalisadas pelas AKR e doenças associadas. (Adaptada de <sup>[7]</sup>).

### 3. AKRI e o seu Envolvimento no Metabolismo Esteróide e Prostaglandínico Humano

As hormonas esteróides têm um papel fundamental no normal funcionamento do organismo, pois estão envolvidas em mecanismos cruciais na regulação de várias funções fisiológicas vitais. As AKRI humanas catalisam, como foi referido, reações que envolvem muitas destas, principalmente nas cadeias de metabolismo do estradiol,  $5\alpha$ -DHT e testosterona, sendo que um desequilíbrio na sua biossíntese e inativação pode gerar defeitos nas suas funções reguladoras e levar ao desenvolvimento de doenças potencialmente fatais como, por exemplo, a cancro da próstata e da mama.

O metabolismo deste tipo de moléculas envolve enzimas de fase I e de fase II. As primeiras, onde se incluem as monooxigenases da família do citocromo P450, as oxidoreductases da família das SRD e AKR, são responsáveis por converter, geralmente por adição de um grupo funcional, determinada molécula num intermediário mais polar e hidrofílico para que, seguidamente, as enzimas de fase II, que incluem sulfotransferases, UDP-glicuronosil transferases (UGTs) e catecol-O-metil transferases (COMT), catalisem reações de conjugação com esse intermediário como substrato de modo a ser(em) adicionado(s) outro(s) grupo(s) funcional(ais) que torna(m) o produto altamente polarizado e hidrofílico e, assim, passível de ser excretado do organismo.

As AKR estão envolvidas tanto na biossíntese como na inativação de hormonas esteróides, ácidos biliares, prostaglandinas e neuroesteróides, desempenhando, assim, uma função reguladora na atividade destes mediadores. Apresentam também afinidade para substratos esteróides sintéticos e conjugados esteróides. As reductases humanas desta superfamília com importância mais significativa nesta regulação são as das subfamílias IC e ID. As AKRIC,  $3\alpha$ -hidroxiesteróide desidrogenases, estão diferencialmente distribuídas no organismo e apresentam especificidades para substratos distintos, fazendo assim refletir as suas também diferentes funções consoante os órgãos onde atuam. A referida distribuição diferencial das diversas isoformas das AKR nos tecidos alvo de hormonas esteróides contribui para a manutenção de um estado pró-estrogénico e pró-androgénico<sup>[7]</sup>. Já no fígado, a função predominante é a de catalisar, em conjunto com as  $5\alpha$ - e  $5\beta$ -reductases, a conversão de  $5\alpha$ - e  $5\beta$ -dihidroesteróides em  $5\alpha$ - e  $5\beta$ -tetrahydroesteróides, inativando assim os primeiros e, conseqüentemente, limitando a sua atividade biológica e prevenindo concentrações superiores às adequadas para a manutenção do equilíbrio fisiológico.

### 3.1. AKRI nas Vias Metabólicas Androgénicas

A  $5\alpha$ -DHT é o androgénio endógeno mais potente, tendo mais afinidade e apresentando maior especificidade para os recetores específicos androgénicos (AR) que outras hormonas semelhantes, incluindo a testosterona. É produzido a partir de testosterona circulante ou de outros derivados androgénicos, tanto em indivíduos do sexo feminino como masculino, possuindo um vasto leque de funções fisiológicas importantes. As AKRIC têm um papel fundamental na regulação da sua concentração plasmática e, portanto, atividade, visto que estão envolvidas tanto na sua biossíntese como na sua inativação.

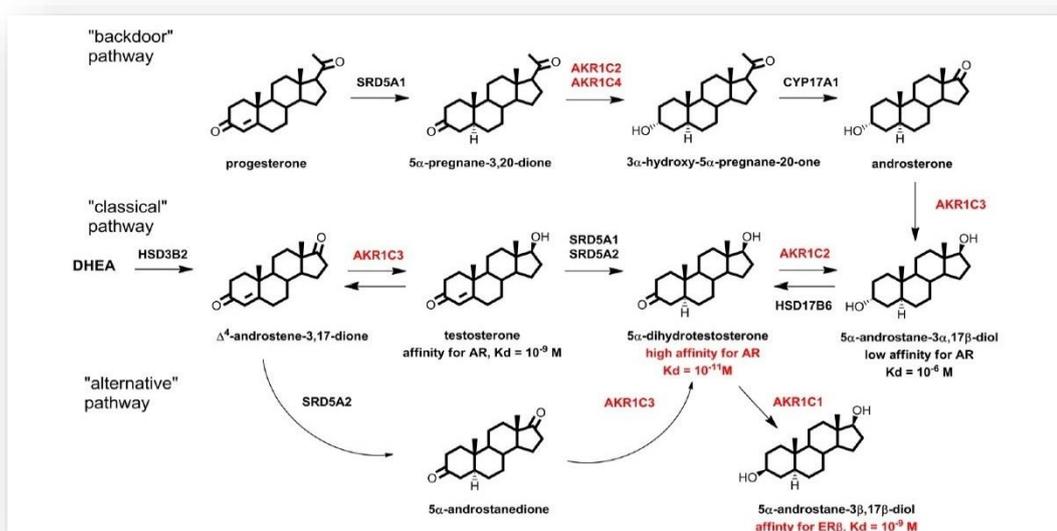
As AKRIC atuam como 3-ceto e 17-cetoesteróide reductases nos tecidos periféricos catalisando tanto a formação da  $5\alpha$ -DHT como a sua inativação em  $3\alpha$ -androstenediol ou  $3\beta$ -androstenediol.

Existem várias vias biossintéticas que levam à formação desta hormona. Na via de produção clássica, a desidroepiandrosterona (DHEA), que é produzida por um mecanismo autócrino a partir do colesterol pelas glândulas suprarrenais, tecido adiposo, cérebro, pele e, principalmente, testículos, é convertida a androstenediona numa reação catalisada pela hidroxisteróide desidrogenase (HSD) 3B2. Esta é subsequentemente convertida em testosterona pela AKRIC3, também designada de  $17\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase ( $17\beta$ -HSD), por redução do grupo  $17\beta$ -ceto da androstenediona a hidroxilo, sendo esta a enzima que apresenta maior eficiência catalítica na mediação desta conversão. A  $5\alpha$ -DHT é formada num passo anabólico seguinte por ação das SRD5A1 ou SRD5A2, também designadas de  $5\alpha$ -reductases.

Existem também vias alternativas pelas quais se produz o mais potente androgénio endógeno e em que também estão envolvidas AKR. Uma passa pela redução da androstenediona, pela SRD5A2, a  $5\alpha$ -androstano-diona, com subsequente redução do seu grupo 17-ceto pela AKRIC3, originando assim  $5\alpha$ -DHT. Assim, por esta via, há um *bypass* à testosterona, não sendo necessária como intermediário de reação<sup>[7]</sup>. Outra via para a síntese de  $5\alpha$ -DHT é a partir da progesterona. Esta é convertida em  $5\alpha$ -pregnano-3,20-diona ( $5\alpha$ -dihidroxiprogesterona,  $5\alpha$ -DHP) pela SRD5A1, depois reduzida a  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnano-20-ona (Alopregnanolona) pela AKRIC2 ou IC4 e, de seguida, por ação da CYP17A1, convertida em androsterona. A última é também substrato da AKRIC3, que a reduz a  $3\alpha$ -, um androgénio com fraca afinidade para o AR, mas que pode ser oxidado a  $5\alpha$ -DHT por ação de oxidases da família das SDR como a HSD  $17\beta$ 6.

Como acima mencionado, outras AKRIC apresentam também funções na inativação da 5 $\alpha$ -DHT. A AKRIC2 é a que apresenta maior eficiência catalítica na metabolização desta hormona. Atua por redução do grupo 3 $\beta$ -ceto da referida hormona a 3 $\alpha$ -hidroxilo, formando assim 3 $\alpha$ -androstenediol, com pouca afinidade para o AR. Por outro lado, a AKRIC1 tem a capacidade de reduzir a 5 $\alpha$ -DHT a 3 $\beta$ -androstenediol, composto que apresenta elevada afinidade para o recetor estrogénico  $\beta$  (ER $\beta$ ). No fígado, a testosterona circulante pode ser convertida em 5 $\alpha$ - e 5 $\beta$ -DHT pelas 5 $\alpha$ - e 5 $\beta$ - reductases, respetivamente, sendo depois reduzidos pelas AKR a 3 $\alpha$ - e 3 $\beta$ -androstenediol. Estes últimos podem, subseqüentemente, ser convertidos em eticolanolona ou androsterona, sendo estes produtos passíveis de serem conjugados por enzimas de fase II, nomeadamente a UGT, e posteriormente excretados, constituindo esta a principal forma de eliminação de esteróides androgénicos do organismo.

As AKR estão, portanto, profundamente envolvidas na síntese e metabolismo da 5 $\alpha$ -DHT, tanto pela via clássica através da testosterona, como por vias alternativas através de pregnanos e da 5 $\alpha$ -androstenediona, sendo assim cruciais na sua regulação e um possível e atrativo alvo terapêutico no combate a diversas patologias onde essas hormonas têm influência direta, como o cancro da próstata ou a hiperplasia benigna da próstata (HBP). A AKRIC3, por estar envolvido em todas as vias referidas, tem atraído especial atenção por parte da comunidade científica.



**Figura 3.** Aldo-ceto reductases nas vias metabólicas androgénicas (Adaptado de<sup>[7]</sup>).

### 3.2. AKRI nas Vias Metabólicas Estrogénicas e Progestagénicas

O estradiol é o estrogénio endógeno com maior afinidade para os recetores estrogénicos  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) e  $\beta$  ( $ER\beta$ ). Esta hormona pode ser produto da redução da estrona, um fraco agonista dos receptores suprarreferidos, reacção que a AKRIC3 tem capacidade de catalisar, onde atua com 17-cetoesteróide reductase na conversão. Esta enzima é muito mais eficiente na catalisação desta reacção que na redução da androstenediona a testosterona. As outras proteínas da mesma família apresentam uma atividade muito mais baixa na formação de estradiol que a IC3.

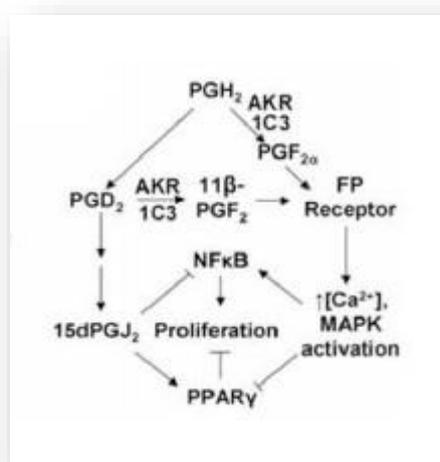
No metabolismo da progesterona atuam, em diferentes passos, todas as AKRIC humanas, bem como a AKRID1. A AKRIC1, e, em menor extensão IC2 e IC3, podem mediar a redução da hormona, que apresenta elevada afinidade para os recetores da progesterona (PR) A e B, formando como produto a 20 $\alpha$ -hidroxi-pregn-4-ene-3-ona, um progestagénio muito menos potente. No fígado e em alguns tecidos periféricos, como a placenta ou o miométrio, a progesterona pode também ser reduzida a 5 $\alpha$  e 5 $\beta$ -pregnanos. A AKRID1 converte a referida hormona 5 $\beta$ -dihidroxiprogesterona (5 $\beta$ -DHP), enquanto as 5 $\alpha$ -reductases SRD5A1 e 5A2 catalisam a sua conversão em 5 $\alpha$ -DHP. A última pode sofrer uma primeira redução do grupo 20-ceto pela AKRIC1 e, de seguida, do grupo 3-ceto pela AKRIC1, IC2, ou IC3, para formar 5 $\alpha$ -pregnano-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol, ou, por outra via, pode ser primeiro reduzido o grupo 3-ceto pela AKRIC2 ou IC4 e, posteriormente, no grupo 20-ceto também pela AKRIC1, sendo o produto final o mesmo. Na via em que a cetona na posição 3 é reduzida primeiro, o intermediário que se forma é a alopregnanolona. Este derivado progestagénico, bem como outros 5 $\alpha$ -pregnanos, é um potente ligando dos recetores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico A ( $GABA_A$ ) e, embora inerte na ausência de GABA, potencia a abertura do canal iónico de cloro na sua presença, sendo, assim, um poderoso regulador alostérico positivo deste recetor e, pelo seu envolvimento nas vias metabólicas que levam à sua síntese, também as AKR são um importante regulador da sua atividade.

### 3.3. AKR nas Vias Metabólicas Prostaglandínicas

Além do papel relevante que a subfamília IC das AKR tem nas vias metabólicas de várias hormonas esteróides, está também envolvida na mediação da biossíntese de algumas prostaglandinas.

O primeiro passo deste processo é a conversão de ácido araquidónico em  $\text{PGH}_2$  pela ciclo-oxigenase (COX), que pode ser posteriormente convertida em vários mediadores:  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ , tromboxano  $\text{A}_2$  ou  $\text{PGF}_2\alpha$ . É a AKR1C3 que catalisa a reação de formação de  $\text{PGF}_2\alpha$ , por redução do grupo endoperóxido do referido precursor. Tem também a capacidade de reduzir o grupo aldeído da  $\text{PGD}_2$  para formar  $11\beta\text{-PGF}_2\alpha$ , um estereoisómero biologicamente ativo da  $\text{PGF}_2\alpha$ . Esta prostaglandina pode desencadear a ativação do seu receptor (FP-receptor, recetor da prostaglandina F) com consequente ativação das vias da proteíno-quinases ativadas por mitogénios (MAPK) que, por sua vez, vão fosforilar fatores de transcrição como o recetor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e o fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ), inativando o primeiro e ativando o segundo, resultando num estado celular pró-proliferativo. Por outro lado, a  $\text{PGD}_2$ , por ser instável, é normalmente convertida por meios não enzimáticos a  $\text{PGJ}_2$  e, seguidamente, a 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ - $\text{PGJ}_2$  (15- $\text{PGJ}_2$ ), um derivado prostaglandínico com capacidade para, entre outros fatores nucleares, ativar o PPAR $\gamma$  e inativar o NF $\kappa\text{B}$ , promovendo assim a diferenciação celular e suprimindo a proliferação destas. No entanto, na presença de AKR1C3, há competição para o mesmo substrato e não serão formados tantos prostanóides da série J como na presença de baixas concentrações desta enzima, podendo assim tanto a  $\text{PGH}_2$  como uma porção da  $\text{PGD}_2$  presente ser convertidas nas respetivas prostaglandinas da série F. Assim, um desequilíbrio positivo na síntese destas últimas leva ao desenvolvimento de um estado celular pró-proliferativo [5,6].

Vários estudos constataam e reportam uma sobre expressão da AKR1C3 em diversos tecidos neoplásicos, pensando-se tratar de uma via adaptativa tumoral que lhe permite manter um estado pró-proliferativo e continuar a crescer na ausência de hormonas das quais, normalmente, depende, através da regulação de prostaglandinas [5,6,13].



**Figura 4.** Reduções catalisadas pela AKR1C3 no metabolismo de prostaglandinas. (Adaptado de [15]).

### 3.4. AKRIC no Controlo de Receptores Esteróides

A família AKRIC, pelo envolvimento que tem na biossíntese e metabolismo de hormonas esteróides, acaba por ter um papel importante na regulação da transcrição de genes associados à atividade de recetores destas. Por catalisar a conversão de ligandos fracos a potentes ou, por outro lado, mediar a reação inversa, estas enzimas têm a capacidade de controlar os níveis de ocupação e, conseqüentemente, a ativação de recetores nucleares em tecidos endócrinos alvo de esteróides, recetores esses que se ligam a elementos de resposta do DNA como homo e heterodímeros e recrutam co-ativadores ou co-repressores genéticos para mediar as mais diversas respostas celulares.

No recetor androgénico, a ocupação e ativação é controlada maioritariamente pelas AKRIC3 e AKRIC2. A primeira, como foi referido anteriormente, catalisa pela redução da androstenediona a testosterona e da androstenediona a  $5\alpha$ -DHT, ambos potentes agonistas do recetor AR. A última, por outro lado, converte a  $5\alpha$ -DHT em  $3\alpha$ -androstane- $3\beta$ -diol, com pouca afinidade para o referido recetor. Assim, a influência que estas enzimas podem ter no rácio entre hormonas com maior e menor afinidade para os recetores androgénicos e, conseqüentemente, na ocupação destes, pode ser determinante na progressão de várias doenças dependentes da atividade androgénica, como o cancro da próstata.

Nos recetores estrogénicos, são as AKRIC1 e, novamente, a AKRIC3, a ter um papel crucial no controlo da concentração dos principais agonistas destes e, portanto, na sua atividade. O estradiol tem elevada afinidade tanto para o recetor  $ER\alpha$  como para o  $ER\beta$  e pode ser produto da redução da estrona, estrogénio menos potente, pela AKRIC3. A AKRIC1 catalisa a redução da  $5\alpha$ -DHT a  $3\beta$ -androstane- $3\beta$ -diol. Este último, embora tenha um esqueleto androgénico, apresenta forte agonismo para o  $ER\beta$ . No entanto, sendo um agonista relativamente fraco do AR, pensa-se que este possa também estar ligado a mecanismos pró-apoptóticos no tecido prostático. As reações referidas têm importância no contexto da progressão de algumas doenças de tecidos estrogénicos, como o cancro da mama ou do endométrio, estando a ocupação do  $ER\alpha$  associada a respostas celulares pró-proliferativas e a do  $ER\beta$  a respostas anti-proliferativas<sup>[7]</sup>.

Os recetores da PR-A e PR-B têm a sua ocupação regulada pela concentração de progesterona. Esta hormona é substrato tanto da AKRIC2 como da AKRIC3, que, por catalisarem a sua inativação, têm um papel relevante na atividade dos recetores mencionados em tecidos onde esta atua, como a mama e o endométrio.

## **4. AKRIC e o Seu Envolvimento no Cancro da Próstata e da Mama**

Pelo seu envolvimento na regulação da concentração de esteróides e, consequentemente, na atividade dos seus recetores, nomeadamente ER, AR e PR, pensa-se que família I das AKR possa ter um papel importante e ativo na patogénese de algumas doenças hormono-dependentes. Vários estudos demonstram uma expressão alterada destas enzimas em tais doenças, como é o caso do cancro da mama e da próstata, em que o crescimento e desenvolvimento do tumor é estimulado por hormonas esteróides, bem como em vertentes hormono-independentes das mesmas <sup>[5,8,9]</sup>.

### **4.1. AKRIC e o seu Envolvimento no Cancro da Próstata**

Os androgénios, principalmente a testosterona e a 5 $\alpha$ -DHT, promovem a proliferação das células da próstata. Quando existe um desequilíbrio na génese/apoptose destas, que pode ter várias etiologias, o órgão cresce, podendo originar patologias como a hiperplasia benigna da próstata (HBP) ou o cancro da próstata. A última é a neoplasia maligna mais frequente e a segunda causa de mortalidade em homens no mundo ocidental, sendo que uma percentagem elevada, cerca de 40%, desenvolve metástases <sup>[10,11,12]</sup>. Nestes cancros já metastizados e, portanto, em estádios mais avançados da doença, recorre-se normalmente a cirurgia ou terapêuticas sistémicas hormonais com o intuito de tentar reduzir as concentrações circulantes dos androgénios mais potentes e, assim, impedir o desenvolvimento da doença. As terapias de privação androgénica envolvem normalmente a orquiectomia (castração cirúrgica), tratamento com agonistas da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), tratamento com antiandrogénios ou a combinação das duas últimas. No entanto, estes métodos atuam apenas na produção hormonal nos testículos que, embora seja onde a maior parte é sintetizada, não é a sua única fonte endógena. Assim, as terapêuticas de privação androgénica são inicialmente bastante eficazes, mas rapidamente, geralmente após 1 a 2 anos de tratamento, se tornam refratárias devido a uma resposta adaptativa das células neoplásicas que passam a usar outras fontes de androgénios não-testiculares, nomeadamente as glândulas suprarrenais <sup>[10,11,12]</sup>. Quando a doença continua a progredir em tais condições passa a designar-se cancro da próstata resistente à castração (CPRC) e considera-se hormono-independente, sendo o prognóstico bastante mais pessimista e reservado neste caso <sup>[10,11,12]</sup>.

É facto que os genes das AKRIC2 e IC3 são abundantemente expressos na próstata saudável pois têm um papel ativo na regulação dos AR, como referido anteriormente, contudo,

Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata nas situações de doença supra referidas, essa expressão aparece frequentemente alterada [5, 7, 12, 13].

O envolvimento da AKRIC3 no cancro da próstata tem sido, então, alvo de vários estudos nos últimos anos para se tentar aferir o seu papel no desenvolvimento desta doença. No cancro da próstata primário, ou seja, quando ainda não metastizou e está localizado apenas no órgão, não se verifica consistentemente a sobre expressão desta enzima, encontrando-se aumentada nalguns indivíduos e reduzida noutros, não se podendo fazer uma firme correlação entre as suas concentrações no tecido prostático e o desenvolvimento da doença, nem tão-pouco tirar elações sobre o seu papel neste estágio da doença [5,7,9].

Contrariamente, vários estudos onde foram usadas diferentes técnicas e diferentes suportes, tanto linhas celulares como amostras de tecido prostático saudável e tumoral em diferentes estádios da doença, demonstram que, nos casos em que o cancro evoluiu para CPRC, a AKRIC3 se encontra consistentemente sobre regulada, apresentando concentrações bastante superiores comparativamente às encontradas em tecido prostático com cancro primário. Num deles, por análises *microarray* feitas em tecido metastático insensitivo a terapia anti-androgénica, com validação por *polymerase chain reaction* (PCR) em tempo real, foi medido um aumento coordenado na expressão de AKRIC1, IC2 e IC3, sendo nesta última mais de 5 vezes superior quando comparado com tecido prostático com cancro primário [5]. Noutro, realizado em linhas celulares derivadas de amostras tecidulares de doentes com a doença, é constatado que, quando tratadas com androgénios, a expressão de AKRIC3 é diminuída, enquanto que quando deplecionadas destas hormonas, esta é dramaticamente aumentada [13]. Noutro ainda, onde se usaram técnicas de silenciamento genético, verificou-se que o *knockdown* do gene da AKRIC3 levou a um aumento da apoptose, inibição do crescimento e proliferação de células prostáticas cancerígenas enquanto, pelo contrário, a sua sobre expressão aumentava a proliferação destas [12].

Coletivamente, estes estudos sugerem que esta enzima tem um papel fundamental na manutenção do tumor em ambientes deplecionados de androgénios, funcionando como um pivô suficientemente eficaz na esteroidogénese das hormonas que este necessita para proliferar quando as principais fontes endógenas destas foram inibidas.

Conclui-se, assim, que esta proteína é sobre expressa num ambiente deplecionado de androgénios e supõe-se ser parte de uma complexa resposta adaptativa do tumor para produzir androgénios e continuar a crescer em situações em que os níveis circulantes dessas hormonas são considerados de castração, tornando-se insensitivo à privação androgénica

Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata mesmo sendo dependente dessas hormonas. Isto acontece porque, como foi abordado em capítulos anteriores, a AKRIC3 tem a capacidade de mediar a génese de tais esteróides mesmo nessas condições visto que, além de catalisar a conversão de androstenediona a testosterona pela via clássica de produção DHEA→Androstenediona→Testosterona→5α-DHT, está também envolvida noutras duas vias alternativas que levam à formação de 5α-DHT onde há um *bypass* à testosterona: a da DHEA→androstenediona→5α-androstanediona→5α-DHT, onde é responsável pelo último passo; e a via dos pregnanos, cuja sequência é progesterona→5α-dihidroprogesterona→alopregnenolona→androsterona→3α-androstanediol→5α-DHT, catalisando a AKRIC3 a redução da androsterona a 3α-androstanediol. Além de estar envolvida em passos essenciais na síntese de 5α-DHT por estas vias alternativas, o facto de catalisar a conversão de PGH<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> a PGF<sub>2</sub>α e 11β-PGF<sub>2</sub>α, respectivamente, favorece ainda mais o estado pró-proliferativo do tumor por inibição dos efeitos do PPARγ pelos mecanismos explicados em capítulos anteriores.

A AKRIC3 revela-se, assim, um alvo terapêutico com um elevado potencial em doentes com cancros da próstata hormono-independentes, ou, pelo menos, para uma subpopulação de doentes em que esta enzima é sobre expressa. A inibição desta enzima pode bloquear muitas vias pelas quais o tumor tem acesso aos androgénios que necessita para proliferar e, por isso, ser extremamente benéfica e desejável na prevenção da progressão e até reversão da doença.

## 4.2. AKRIC e o seu Envolvimento no Cancro da Mama

O cancro da mama é a tumor maligno mais frequente na mulher, com uma incidência de 90 novos casos por 100.000 habitantes na Europa Ocidental, dobrando se só tivermos em conta mulheres acima dos 50 anos, pois a idade é o principal factor de risco para o desenvolvimento da patologia. Apesar da taxa de mortalidade ser relativamente baixa, é uma das principais causas de mortes entre indivíduos do sexo feminino devido à sua elevada prevalência. De notar que esta doença não é exclusiva das mulheres, podendo, raramente, ocorrer em homens, adolescentes e crianças<sup>[14]</sup>.

O cancro da mama consiste num grupo heterogéneo de doenças com diversos subtipos, tanto invasivos como não-invasivos, e que envolvem terapias e têm prognósticos diferentes. O tipo mais frequente é o carcinoma, que tem origem na componente epitelial da mama, e que pode ser classificado em ductal, com origem nas células dos ductos, ou lobular, se esta for nas células dos lóbulos. Enquanto as células neoplásicas proliferam apenas dentro

Aldo-Ceto Reductases: Envolvimento no Metabolismo Esteróide Humano e Implicações no Cancro da Mama e da Próstata

destas estruturas, o carcinoma denomina-se *in situ*, no entanto, tem grande potencial para invadir outros tecidos, sendo, na verdade, uma questão de tempo na maioria dos casos. Quando estas conseguem infiltrar e atravessar a membrana basal que separa as referidas estruturas do restante tecido mamário, o tumor pode então migrar e espalhar-se sob a forma de metástases para tecido conjuntivo mamário e outros órgãos, passando-se a designar carcinoma invasivo. Outra subdivisão que é feita para melhor classificar cada caso deste tipo de carcinomas é a avaliação sistemática dos recetores que este expressa. São, assim, no ato de diagnóstico, pesquisadas a expressão de ER, PR e de recetores do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2) - um oncogene associado à normal proliferação epitelial mas que, nalguns casos de cancro da mama, aparece sobre expresso. Esta avaliação permite assim subdividir os carcinomas em recetores endócrinos positivo (ER e/ou PR+); HER2 positivo; triplo negativo, quando não expressa nenhum dos anteriores; ou triplo positivo, quando os expressa todos. É esta expressão de recetores que determina qual a hormona da qual o tumor depende para proliferar, sendo que no triplo negativo o crescimento pode envolver vias androgénicas ou defeitos genéticos em células epiteliais, embora os mecanismos pelos quais se desenvolve ainda não sejam totalmente claros. Toda esta caracterização do tipo de carcinoma na fase de diagnóstico é crucial para determinar qual o tipo de terapêutica com maior probabilidade de sucesso a aplicar em cada caso. Consoante o estágio da doença, pode envolver cirurgia, quimio e radioterapia, e, quando ER+ e/ou HER2+, terapia hormonal antiestrogénica e anti-HER2.

Como abordado em capítulos anteriores, as AKR, principalmente da subfamília IC, estão envolvidas e podem ter um papel relevante na regulação da expressão e controlo de recetores de hormonas que podem ter implicações relevantes no cancro suprarreferido. A inibição de um estado pró-estrogénico é, sem dúvida, uma estratégia eficaz para o combate à progressão do cancro da mama. A AKRIC3, entre outras, catalisa a redução de androstenediona a testosterona que, por ação de uma aromatase, pode ser convertida em estradiol. Catalisa também a redução de estrona a estradiol, após a primeira ter sido convertida da androstenediona, também com catálise de uma aromatase. Estas reduções podem ser mediadas por outras 17 $\beta$ -HSD, no entanto, pensa-se que a AKRIC3 seja a enzima primariamente envolvida na mediação destas reações nos tecidos periféricos <sup>[15]</sup>. A progesterona, por outro lado, pode ser reduzida pela AKRIC1 a 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, um progestagénio pouco potente e com pouca afinidade para o PR.

Assim, o efeito combinado destas reduções mediadas pelas AKR1C1 e AKR1C3 pode promover um estado pró-estrogénico no tecido mamário que claramente contribui para o desenvolvimento, crescimento e metastização do tumor, no entanto, no que à progesterona concerne, a relação entre a sinalização desta e o seu efeito no cancro da mama ainda não é claro.

A semelhança do que acontece no cancro da próstata, os mecanismos envolvendo prostaglandinas também parecem ter um papel importante no desenvolvimento de carcinomas da mama. Assim, a catalisação da conversão de  $\text{PGH}_2$  e  $\text{PGD}_2$  a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $11\beta\text{-PGF}_{2\alpha}$ , respectivamente, induz a ativação da cascata de sinalização MAPK, com consequente ativação do PPAR $\gamma$  e inativação do NF $\kappa$ B, resultando numa sinalização pró-proliferativa, e, além disso, inibe a formação dos prostanóides da série J, impedindo-os de exercerem os seus efeitos anti-inflamatórios e anti-proliferativos.

Um estudo, onde foi usado PCR em tempo real semi-quantitativo, foi demonstrado que o tecido mamário saudável expressa elevados níveis de AKR1C3 comparado com outros tecidos<sup>[15]</sup>. Mais ainda, recorrendo desta vez a técnicas de imuno-histoquímica, verificou-se que esta expressão é ainda maior em doentes com tumores ductais invasivos ER e PR+, dos mais comuns entre os tumores mamários, quando comparado com os tecidos envolventes deste<sup>[5,15]</sup>.

A literatura, no que toca à sobre expressão de AKR1C3 no cancro da mama, pode ser, por vezes, um pouco dúbia. Muitos estudos têm sido realizados para tentar perceber o papel desta enzima na doença, com ensaios realizados tanto em amostras de tecido tumoral como em linhas celulares, principalmente MCF-7, no entanto, nem todos verificam níveis elevados da AKR1C3 nos diferentes tipos de cancro da mama. Por vezes, até, para o mesmo tipo de tumor, uns indicam existir concentrações supra-fisiológicas desta enzima no tecido neoplásico enquanto outras não o verificam. Não se verifica assim, para já, uma forte correlação entre elevados níveis desta proteína e a ocorrência e desenvolvimento de cancro da mama mas, no entanto, pensa-se que uma subpopulação de doentes com esta patologia a sobre expressam-na e que, nestes, a inibição desta proteína com complementar inibição das aromatases poderia ser bastante interessante e benéfica no sentido em que priva o tumor dos estrogénios de que necessita para a manutenção do seu estado pró-proliferativo através diferentes vias biossintéticas. No entanto, embora haja esta divergência de resultados, a grande maioria dos autores refere que, quando a AKR1C3 se encontra sobre regulada, o prognóstico é bastante menos animador e a taxa de recidiva aumenta dramaticamente.

## 5. Considerações Finais

Como foi abordado ao longo da monografia, as aldo-ceto reductases são uma superfamília de oxidoreductases em que as suas isoformas humanas estão profundamente envolvidas na biossíntese e vias metabólicas de várias hormonas esteróides e prostaglandinas. Embora a atividade de muitas destas enzimas, principalmente da subfamília AKR1C, e as suas implicações nestes processos tenham sido bastante estudadas e descritas na literatura nas últimas décadas, o seu real papel em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos está ainda por compreender.

O cancro da próstata e da mama, dois tipos de neoplasia com enorme prevalência e taxa de mortalidade nos dias que correm, dependem da produção local de esteróides para estimular a sua proliferação celular. Relativamente ao primeiro, vários estudos demonstram haver uma consistente sobre expressão de AKR1C3 em cancros da próstata resistentes à castração quando comparados com tecido prostático saudável e tecido com cancro primário. Quer pela sua capacidade de produzir androgénios por vias alternativas e que fazem *bypass* à testosterona, quer pelo seu papel na síntese de prostaglandinas, infere-se que a sua sobreexpressão é parte de uma resposta adaptativa tumoral que lhe permite continuar a proliferar num ambiente deplecionado das hormonas que necessita para tal, o que é consistente com o facto de, normalmente, as terapêuticas de privação de androgénios como a orquiectomia, tratamento com agonistas da hormona libertadora de gonadotrofinas e/ou tratamento com antiandrogénios, se tornem refratárias e obsoletas, em muitos casos, após um ou dois anos.

Relativamente ao cancro da mama, há mais inconsistências e uma menos clara compreensão da relação da sobre-expressão de aldo-ceto reductases e evolução do tumor, talvez devido ao facto de ser uma doença extremamente complexa e variável. É certo que estas enzimas estão envolvidas na biossíntese de estradiol e progesterona, bem como de prostaglandinas, mas, no entanto, não se verifica consistentemente uma sobreexpressão destas enzimas, não sendo claro o real papel destas na doença. Contudo, nos casos em que se verifica, tem um papel relevante no desenvolvimento e prognóstico da mesma.

Assim, embora hajam, por vezes, algumas divergências na literatura sobre a sobre expressão ou não de enzimas desta família em diferentes casos dos referidos cancros, é consensual que, quando se verifica, está-lhe sempre associado um pior prognóstico para o doente bem como um maior risco de recidiva.

Os cancros, em geral, são doenças em constante evolução, sofrendo frequentemente alterações genéticas que lhes permitem proliferar mesmo em ambientes adversos a tal. Assim, a busca por novas abordagens terapêuticas nesta área é constante, tentando-se sempre cobrir todas as vias às quais os tumores podem recorrer para se continuarem a desenvolver.

A inibição seletiva de algumas aldo-ceto reductases pode ser de extrema utilidade em cancros como o da mama e da próstata. Provavelmente não em todos os casos, mas, naqueles em que se verifique a sobre expressão destas enzimas, o seu bloqueio pode impedir o acesso por parte do tumor a esteróides essenciais para o desenvolvimento deste, prevenindo a sua proliferação e, possivelmente, promovendo a sua regressão. Desta forma, tem sido feito muito trabalho de investigação na tentativa de desenvolver um inibidor seletivo para algumas destas enzimas. Embora ainda não haja nenhum em fases de ensaio mais avançadas e mais perto de se poderem tornar uma terapêutica viável, eficaz e segura para estes tipos de cancro, há já vários grupos farmacológicos descritos como tendo actividade inibidora destas enzimas, já existindo, inclusivamente, algumas moléculas sintéticas que apresentam tal actividade<sup>[16]</sup> e com potencial para, no futuro, se tornarem uma opção terapêutica.

## 6. Bibliografia

1. Gene Family: Aldo-keto reductases (AKR). Acedido a 15 de março de 2015. <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/399>;
2. UPENN Biomedical Graduate Studies | Trevor M. Penning. Acedido a 15 de março de 2015. <http://www.med.upenn.edu/apps/faculty/index.php/g20000220/p12620>;
3. Mindnich, D. Rebekka, Penning, T. M. (2009). Aldo-Keto Reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation;
4. Penning, T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 236-246. doi:10.1016/j.cbi.2014.09.024;
5. Penning, T. M., & Byrns, M. C. (2009). Steroid Hormone Transforming Aldo-Keto Reductases and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155(1), 33-42. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.03700.x;
6. Barski, O. A., Tipparaju, S. M., & Bhatnagar, A. (2008). The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40(4), 553-624. doi:10.1080/03602530802431439;
7. Rižner, T. L., & Penning, T. M. (2014). Role of Aldo-Keto Reductase family I (AKRI) Enzymes in Human Steroid Metabolism. *Steroids*, 79, 49-63. doi:10.1016/j.steroids.2013.10.012;
8. Wang, S., Yang, Q., Fung, K., & Lin, H. (2008). AKRIC2 and AKRIC3 mediated prostaglandin D2 metabolism augments the PI3K/Akt proliferative signaling pathway in human prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 289(1-2), 60-66. doi:10.1016/j.mce.2008.04.004;
9. Dozmorov, M. G., Azzarello, J. T., Wren, J. D., Fung, K., Yang, Q., Davis, J. S., Lin, H. (2010). Elevated AKRIC3 Expression Promotes Prostate Cancer Cell Survival and Prostate Cell-mediated Endothelial Cell Tube Formation: Implications for Prostate Cancer Progression. *BMC Cancer*, 10(1). doi:10.1186/1471-2407-10-672;
10. Rodrigues, S., Dores, M., Metrogos, V., Rodrigues, M., Neto Gomes, P., Cabrita, M., Rosa, G., Coutinho, A., Neves, J. (2014). Carcinoma da Próstata Metastático Resistente à Castração – Novas Abordagens Terapêuticas;
11. Magalhães, R. P. F., (2014). Tratamento do Carcinoma da Próstata Resistente à Castração.
12. Deniji, A. O., Chen, M., & Penning, T. M. (2013). AKRIC3 as a Target in Castrate Resistant Prostate Cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 136-149. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.05.012;
13. Pfeiffer, M. J., Smit, F. P., Sedelaar, J. M. M., Schalken, J. A. (2011). Steroidogenic Enzymes and Stem Cell Markers are Upregulated During Androgen Deprivation in Prostate Cancer;

- 14.** Overview of Breast Cancer. Acedido a 21 de abril de 2016. <http://pathology.jhu.edu/breast/overview.php>
- 15.** Byrns, M. C., & Penning, T. M. (2009). Type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenase/Prostaglandin F Synthase (AKR1C3): Role in Breast Cancer and Inhibition by Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Analogs. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3), 221-227. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.024;
- 16.** Yin, Y. D., Fu, M., Brooke, D. G., Heinrich, D. M., Denny, W. A., & Jamieson, S. M. (2014). The Activity of SN33638, an Inhibitor of AKR1C3, on Testosterone and 17 $\beta$ -Estradiol Production and Function in Castration-Resistant Prostate Cancer and ER-Positive Breast Cancer. *Front. Oncol. Frontiers in Oncology*, 4. doi:10.3389/fonc.2014.00159;
- 17.** Jin, J. (2006). Role of aldo-keto reductases in development of prostate and breast cancer. *Frontiers in Bioscience Front Biosci*, 11(1), 2767. doi:10.2741/2006;
- 18.** Mitsiades, N., Sung, C. C., Schultz, N., Danila, D. C., He, B., Eedunuri, V. K., Scher, H. I. (2012). Distinct Patterns of Dysregulated Expression of Enzymes Involved in Androgen Synthesis and Metabolism in Metastatic Prostate Cancer Tumors. *Cancer Research*, 72(23), 6142-6152. doi:10.1158/0008-5472.can-12-1335;
- 19.** Doig, C. L., Battaglia, S., Khanim, F. L., Bunce, C. M., & Campbell, M. J. (2016). Knockdown of AKR1C3 exposes a potential epigenetic susceptibility in prostate cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 47-55. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.09.037;
- 20.** Byrns, M. C., Duan, L., Lee, S. H., Blair, I. A., & Penning, T. M. (2010). Aldo-keto reductase 1C3 expression in MCF-7 cells reveals roles in steroid hormone and prostaglandin metabolism that may explain its over-expression in breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), 177-187. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.12.009;
- 21.** Byrns, M. C., Jin, Y., & Penning, T. M. (2011). Inhibitors of type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1-2), 95-104. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.11.004;