

BIOMARCADORES NA TRIAGEM DO CÂNCER DO COLO UTERINO

BIOMARKERS IN CERVICAL CANCER SCREENING

Lara Termini¹ & Luisa Lina Villa¹

RESUMO

A infecção persistente por papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras. Programas de triagem que utilizam a citologia oncológica (exame de Papanicolaou) levaram a uma diminuição significativa na incidência deste tipo tumoral, apesar de suas limitações na detecção de atipias leves e adenocarcinomas. Em vista disso, a identificação de novos biomarcadores que permitam monitorar eventos moleculares associados à progressão tumoral em amostras histológicas ou citológicas, poderá melhorar a detecção de lesões com maior risco de progredirem. A simples detecção do DNA de HPV como principal parâmetro na triagem do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras é ainda um ponto controverso por ter um valor preditivo positivo baixo. Por outro lado, o desenvolvimento de tecnologias que detectem e quantifiquem os transcritos dos oncogenes virais E6 e E7, estão sendo consideradas para a avaliação precisa da atividade oncogênica viral associada à progressão tumoral. Além disso, análises detalhadas das interações das oncoproteínas de HPV e seus alvos celulares permitirão definir possíveis novos biomarcadores. Um dos principais exemplos é o aumento da expressão da proteína inibitória das quinases dependentes de ciclina p16^{ink4a} promovida pela presença de E7. Diversos estudos utilizam o aumento da expressão da proteína p16^{ink4a} para identificar células displásicas em amostras histológicas e esfregaços cervicais. Esta revisão foca algumas das principais linhas de pesquisa na identificação de biomarcadores e sua possível utilização na triagem do câncer cervical e de suas lesões precursoras.

Palavras-Chave: papilomavírus humano, câncer do colo uterino, biomarcadores, p16

ABSTRACT

Persistent infection with oncogenic human papillomavirus (HPV) is the main risk factor for cervical cancer and its precursor lesions. Cytological screening programs using the Pap test have led to a substantial reduction in the incidence of cervical cancer despite its limitation in detecting minor atypias and adenocarcinomas. Therefore, the identification of new biomarkers that allow the monitoring of molecular events associated to tumor progression in histological or cytological specimens may improve the detection of lesions with higher risk of progression. HPV DNA detection as a primary screening parameter has been controversially discussed due to its very low predictive value. On the other hand, the development of new technologies for the determination of high risk HPV activity by detecting E6 and E7 transcripts has the potential to more accurately evaluate tumor progression. Moreover, the detailed analysis of HPV oncoproteins and cellular targets will allow the definition of new possible biomarkers. One of the best examples is the up-regulation of the cyclin dependent kinase inhibitor p16^{ink4a} expression by E7. Several studies use p16^{ink4a} overexpression to identify dysplastic cells in histological samples and cytological smears. This review focuses on biomarkers studies and their possible role in screening cervical cancer and precursor lesions.

Keywords: human papillomavirus, cervical cancer, tumor biomarkers, p16

INTRODUÇÃO

Determinar o risco de desenvolvimento e o prognóstico, bem como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores. Nesse sentido, um dos exemplos clássicos diz respeito ao prognóstico das neoplasias malignas, cuja identificação se tornou um dos maiores desafios da medicina moderna. A principal estratégia na prevenção e no controle deste tipo de doença é sua detecção precoce, permitindo que intervenções e terapias efetivas possam contribuir para a redução da mortalidade e morbidade por câncer.

Os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão destes marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros. Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, a localização, o estadiamento do tumor, bem como fornece uma avaliação prognóstica do tumor em questão¹.

Ao longo das últimas duas décadas, diversos estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que o carcinoma do colo uterino é uma doença complexa com múltiplos determinantes ambientais e genéticos. As infecções genitais, especialmente as associadas ao papilomavírus humano (HPV) de alto risco, e o comprometimento da resposta imune celular são fatores diretamente envolvidos no processo de transformação maligna². O carcinoma do colo uterino apresenta-se como a segunda neoplasia mais prevalente dentre a população feminina mundial e é responsável por cerca de 250.000 mortes a cada ano no mundo. No Brasil, esta neoplasia situa-se como a terceira mais comum dentre a população feminina, apenas suplantada pelo câncer de pele (não melanoma) e o câncer de mama, sendo a quarta causa de morte feminina por câncer³. O desenvolvimento do câncer do colo uterino está diretamente relacionado à infecção persistente pelo HPV⁴. Estimativas mundiais indicam que aproximadamente 20% de indivíduos normais estão infectados com HPV e que a cada ano surgem em torno de 500.000 casos novos de câncer de colo uterino, dos quais em torno de 70% ocorrem em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Além disso, acredita-se que nestas regiões ocorram de 10 a 20 vezes mais lesões precursoras deste tipo tumoral, o que significa um número elevado de indivíduos acometidos por esta doença⁵.

Atualmente, existem dois tipos de vacinas profiláticas. A vacina bivalente previne a infecção e doenças causadas pelos HPV 16 e 18, enquanto a tetravalente protege contra os HPV 6, 11, 16 e

¹Ludwig Institute for Cancer Research – São Paulo Branch.

18. A utilização destas vacinas prevê uma redução significativa na mortalidade e na morbidade associadas às infecções por HPV, que afetam centenas de milhões de indivíduos a cada ano em todo o mundo⁶⁻⁹. Apesar da alta eficácia comprovada destas vacinas e de sua promissora utilização, vale a pena ressaltar suas limitações. Estas vacinas não protegem contra todos os tipos de HPV e não tratam lesões preexistentes HPV positivas. Além disso, a duração de seu efeito protetor ainda não está estabelecida, devido ao fato de os estudos ainda estarem em andamento. A durabilidade do efeito destas vacinas foi avaliada por apenas 5 anos para a vacina quadrivalente¹⁰ e por 6 anos e meio para a vacina bivalente^{7,11}. Atualmente, diversos grupos em todo o mundo têm testado estratégias para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o HPV, uma vez que as vacinas profiláticas não têm efeito na eliminação de lesões e tumores do colo uterino associados ao HPV. O objetivo destes estudos é a quebra da tolerância estabelecida por proteínas virais e promover resposta imune celular contra antígenos de HPV, principalmente as proteínas E6 e E7. Existem estudos clínicos em andamento com vacinas desenvolvidas contra peptídeos de E6 e E7 de HPV16, mas nenhum deles tem resultados definitivos. Resultados preliminares mostram o surgimento de populações de linfócitos CD4 e CD8 responsivos aos antígenos virais E6 e E7 e que têm capacidade de produção de INF- α ¹².

Pelo exposto, a identificação e a utilização de ferramentas que possam complementar tanto o diagnóstico como o rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo uterino é ainda de suma importância. Uma vez que a grande maioria das lesões precursoras do câncer do colo uterino regride espontaneamente, a identificação de lesões que realmente necessitam ser tratadas evitaria a utilização de tratamentos agressivos desnecessários, enquanto as lesões com maior chance de progredirem seriam passíveis de tratamento antes do desenvolvimento de um câncer invasivo^{13,14}.

TESTES VIGENTES NO RASTREAMENTO DE LESÕES DO COLO UTERINO

Exame de Papanicolaou (citologia oncótica)

O exame de citologia oncótica (Papanicolaou) ainda constitui o principal método utilizado para a detecção do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras. Esta técnica, descrita por George Papanicolaou, em 1941, consiste na avaliação morfológica das células de esfregaços obtidos da superfície do colo uterino. Diversos critérios são utilizados para a avaliação do grau de alteração das células, entre eles, relação núcleo/citoplasma, formato nuclear, intensidade de marcação nuclear e arquitetura da cromatina. Atualmente, a classificação de Bethesda é uma das mais utilizadas para o diagnóstico citológico das amostras provenientes do colo uterino e categoriza as células anormais em lesões intraepiteliais de baixo grau (L-SIL) e lesões intraepiteliais de alto grau (H-SIL)¹⁵. As lesões de baixo grau representam, na sua grande maioria, modificações morfológicas associadas à replicação ativa do HPV (por exemplo, a coilocitose), enquanto as lesões de alto grau indicam a transformação celular, caracterizada principalmente por alterações nucleares. Amplos estudos epidemiológicos têm demonstrado um grande impacto na redução das taxas de incidência do câncer do colo uterino e de suas

lesões precursoras, quando utilizada esta metodologia para o rastreamento desta doença⁵.

Apesar de sua grande especificidade, esta metodologia possui sensibilidade limitada na detecção de lesões precursoras do colo uterino, fato atribuível à variação da interpretação deste método. Este método apresenta uma variabilidade de 34 a 94% na detecção de lesões de alto grau, além de não ser determinante na classificação das amostras atípicas definidas como “células escamosas atípicas de significância não determinada” (ASCUS)¹⁶. A repetição deste tipo de exame se faz necessária para compensar sua baixa sensibilidade. Esta tem sido uma opção utilizada na clínica e que permite rastrear com maior segurança mulheres que porventura apresentem alguma alteração no colo uterino. Vale a pena ressaltar que este tipo de teste possui baixo custo relativo, mas a necessidade de repetições frequentes influencia na elegibilidade deste método para rastreamento desse tipo de lesão¹⁷.

Desta forma, existem controvérsias na literatura quanto à utilização deste exame como triagem única na detecção de lesões precursoras do câncer do colo uterino, principalmente na detecção de adenocarcinomas e de suas lesões precursoras, em que este teste não se mostrou suficientemente sensível. Entretanto, quando bem realizado, o que inclui coleta, processamento e leitura das lâminas, este exame ainda é de fundamental importância no rastreamento do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras¹⁸⁻²¹.

Positividade para HPV

O estabelecimento do HPV como agente etiológico do câncer do colo uterino promoveu, nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de diversas metodologias utilizadas para sua detecção. Desta forma, além do teste de Papanicolaou, a detecção da presença do HPV é atualmente utilizada na triagem de lesões do colo uterino em países como a Holanda. A pesquisa do DNA de HPV é considerada altamente eficaz na detecção de lesões de alto grau, uma vez que a grande maioria destas é positiva para HPV de alto risco. Além disso, este tipo de teste pode ser realizado concomitantemente ao exame de Papanicolaou e pode auxiliar na determinação do diagnóstico e tratamento de lesões precursoras de baixo grau que não apresentaram alterações evidentes na avaliação citológica. Finalmente, este método pode ser utilizado no acompanhamento de possíveis recidivas após o tratamento de lesões precursoras de alto grau e do câncer do colo uterino^{22,23}. Características epidemiológicas da infecção por HPV geram controvérsias sobre a utilização deste tipo de triagem. Devido à alta prevalência de infecções assintomáticas, a mera detecção do HPV de alto risco tem um baixo valor preditivo positivo para a presença da displasia do colo uterino, uma vez que as taxas de prevalência para este tipo viral em mulheres sem lesões variam de 20 a 40%²⁴. Por outro lado, como a persistência da infecção por HPV de alto risco e o câncer do colo uterino estão diretamente relacionados, os testes negativos para a presença viral conferem um alto valor preditivo negativo para o desenvolvimento desta doença. Desta forma, testes negativos para a presença de HPV de alto risco tornam-se de suma importância para a triagem de mulheres que apresentam esfregaço do colo uterino alterado²⁵.

Tecnologias que permitam detectar e quantificar os transcritos dos oncogenes virais E6 e E7 são estratégias atuais que visam avaliar a atividade oncogênica viral. Os principais eventos que provocam a transformação do epitélio do colo uterino são desencadeados pela expressão desregulada dos oncogenes virais E6 e E7 dos HPV de alto risco nas células replicativas basais e parabasais do epitélio infectado. Diversos estudos revelam um padrão complexo de interações das oncoproteínas E6 e E7, com proteínas celulares envolvidas no controle de ciclo celular, apoptose, diferenciação epitelial e homeostase/estabilidade cromossômicas, confirmando o papel do HPV na carcinogênese viral²⁶. Em vista disso, a detecção do RNA de HPV de alto risco é considerada atualmente um dos principais fatores de risco na triagem de lesões de alto grau com maior chance de progredirem para o câncer do colo uterino. Vale a pena citar que a grande maioria das infecções promovidas por este vírus é eliminada em aproximadamente 1 ano, e que apenas uma baixa porcentagem destas persiste, induzindo lesões displásicas que podem progredir para o câncer. O DNA viral pode ser detectado desde lesões benignas, como por exemplo, o condiloma acuminado, até lesões malignas. Por este motivo, a pesquisa dos transcritos E6 e E7 de HPV de alto risco aumentaria a especificidade e sensibilidade destes testes na triagem de lesões com maior chance de progredirem, quando comparada à simples detecção de DNA de HPV²⁷.

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DESREGULADA DOS ONCOGENES DE HPV

A detecção de alterações celulares originadas pela expressão desregulada das oncoproteínas virais pode vir a caracterizar marcadores de progressão tumoral e contribuir, desta forma, para a identificação de populações celulares com maior risco de progredirem para o câncer do colo uterino. A identificação e o estabelecimento do padrão de alteração destes fatores poderão definir marcadores com alto poder preditivo positivo. A utilização destes marcadores complementarará o resultado de outros exames de triagem na identificação de lesões com maior risco de progressão maligna²². As principais linhas de investigação associadas aos aspectos anteriormente mencionados focam, sobretudo, a identificação de proteínas celulares/teciduais ou circulantes, cuja expressão se encontre alterada em resposta à expressão das oncoproteínas virais; a pesquisa de alterações no padrão de metilação de diversos genes celulares que poderão predizer eficientemente a iniciação neoplásica; as modificações nos cromossomos e/ou genoma viral em regiões distintas e reconhecidamente modificadas pelo evento da integração viral; a identificação de polimorfismos de genes associados a um melhor prognóstico. A seguir, serão discutidos os avanços recentes sobre a identificação de potenciais biomarcadores associados ao câncer do colo uterino e a sua possível utilização na triagem desta doença.

Avaliação dos níveis de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular

A infecção pelo HPV promove a replicação desregulada do genoma hospedeiro e, desta forma, diversas proteínas envolvi-

das no controle do ciclo celular têm seus níveis aumentados ou diminuídos. Assim, diversos estudos visam a análise dos níveis de proteínas relacionadas com este evento. Entre elas, os principais exemplos descritos na literatura são p53, p16^{INK4a}, MCM2-7, EGFR, ciclina D, ciclina E, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, entre outras^{19,22,28}. O maior número de estudos encontrados na literatura foca a avaliação dos níveis da proteína p16^{INK4a} em amostras do colo uterino, tanto em cortes histológicos quanto em amostras derivadas de esfregaços cervicais. Sabe-se que as proteínas E6 e E7 de HPV promovem a degradação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb celulares, respectivamente. Esta interferência ativa um processo de retroalimentação negativo que resulta na expressão exacerbada da proteína inibitória dos complexos de quinases dependentes de ciclina, p16^{INK4a}²⁹.

Diversos estudos descrevem o aumento da expressão desta proteína em lesões de alto grau e câncer do colo uterino em cerca de 100% das amostras analisadas, de forma contrária ao observado no epitélio normal da mucosa do colo uterino, onde p16^{INK4a} praticamente não é detectada. Aproximadamente 60% das lesões intraepiteliais de baixo grau são fortemente positivas para p16^{INK4a} (células proliferativas da camada basal e/ou parabasal), enquanto as 40% restantes não apresentam níveis detectáveis desta proteína, apesar de serem positivas para o DNA de HPV e apresentarem características morfológicas associadas a infecção (coilocitose, entre outros). Esta observação sugere que apenas uma parte das lesões de baixo grau infectadas por HPV apresenta a expressão desregulada das oncoproteínas virais nas células basais e parabasais, enquanto nas lesões negativas para p16^{INK4a}, a expressão destas oncoproteínas seria muito baixa ou até mesmo nula neste tipo celular. Desta forma, as lesões de baixo grau que não apresentassem níveis elevados de p16^{INK4a} nas células da camada basal e/ou suprabasal teriam menor chance de progredirem para lesões de alto grau ou câncer. Vale a pena ressaltar que níveis elevados de p16^{INK4a} estão associados a lesões infectadas por HPV de alto risco. O mesmo efeito não é observado nas lesões positivas para HPV de baixo risco³⁰⁻³⁴. A análise desta proteína em amostras originadas de esfregaços do colo uterino mostrou um aumento de expressão de p16^{INK4a} em 98% das amostras derivadas de lesões de alto grau. Desta forma, além da pesquisa desta proteína em biópsias do colo uterino, sua pesquisa em esfregaços poderia ser uma opção na triagem primária de lesões do colo uterino cuja classificação não tenha sido determinada através de citologia oncológica^{26,30}. Diversos estudos prospectivos estão em andamento para confirmar uma possível utilização da proteína p16^{INK4a} no rastreamento inicial do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras.

MARCADORES DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

Aneuploidia do DNA hospedeiro

Alguns estudos mostram que a desregulação da expressão dos oncogenes virais promove instabilidade genômica nas células hospedeiras. A principal característica observada é a presença de aneuploidia, ou seja, alteração do número de cromossomos presentes nas células. Consequentemente, a aneuploidia caracterizaria

lesões HPV positivas, incluindo desta forma as lesões precursoras e o câncer. Alguns estudos indicam que a presença de aneuploidia precede a integração viral no genoma do hospedeiro em lesões displásicas avançadas, inferindo que a integração viral seria uma consequência e não a causa da instabilidade cromossômica^{35,36}.

Integração do HPV

Acredita-se que o DNA do HPV se integre aleatoriamente no genoma hospedeiro durante o processo de reparo que é desencadeado após o surgimento de quebras na dupla fita de DNA do genoma celular. A integração viral seria um indicador de instabilidade genômica durante o processo de transformação celular, uma vez que 80 a 90% das amostras originadas de câncer cervical apresentam DNA de HPV integrado³⁷. Diversas metodologias são descritas e utilizadas para a detecção da integração do DNA de HPV no genoma viral, como por exemplo a técnica de PCR em tempo real, que permite obter uma razão entre os níveis dos genes E2 (frequentemente interrompido na integração viral) e E6/E7 de HPV. Quando não integrado, o genoma viral apresentaria uma razão de 1:1 entre os genes E2 e E6/E7 e na integração do genoma viral ocorreria uma diminuição na detecção do gene E2³⁸. Contudo, uma porcentagem significativa de lesões de baixo grau e de alto grau apresenta cópias do HPV em sua forma episomal, além de cópias integradas. Este aspecto interfere na quantificação direta do número de cópias virais integradas. Além disso, alguns estudos avaliam o sítio de integração do HPV no genoma viral. Esta metodologia poderia ser válida no acompanhamento de mulheres após tratamento prévio, uma vez que o sítio de integração identificado poderia ser utilizado como um marcador tumoral em uma possível reicidiva³⁹.

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS E EVENTOS EPIGENÉTICOS

Polimorfismo no gene p53

Na última década, diversos estudos associaram a presença de polimorfismos no códon 72 do gene p53 a um melhor ou pior prognóstico em pacientes com carcinomas epidermóides do colo uterino. Dados apontaram que a proteína p53 contendo o aminoácido arginina na posição 72 é mais suscetível à degradação promovida por E6 do que a proteína contendo o aminoácido prolina nesta mesma posição. Além disso, este mesmo estudo verificou que pacientes homocigotos para arginina tinham maior risco de desenvolver uma lesão maligna associada ao HPV, quando comparados aos portadores heterocigotos e homocigotos para prolina^{40,41}. Esses dados, entretanto, são alvo de grande controvérsia, uma vez que as observações realizadas por diversos estudos são contraditórias⁴²⁻⁴⁴.

Avaliação de eventos epigenéticos

A metilação é o principal fenômeno epigenético pelo qual um gene é silenciado, sendo um importante meio de regulação da expressão gênica. Este processo ocorre através da adição de um radical metila, ligado covalentemente às citosinas presentes na estrutura do DNA. Locais particularmente suscetíveis ao efeito

da metilação são os dinucleotídeos CpG, que contêm as bases citosina e guanina adjacentes. A maioria desses dinucleotídeos localiza-se em pequenas regiões, denominadas ilhas CpG, que em células normais se encontram desmetiladas. Estas regiões geralmente são encontradas nas sequências regulatórias presentes na extremidade 5' de cada gene, onde se localizam os promotores gênicos. A metilação destas regiões interrompe a transcrição dos genes através do silenciamento de seus promotores.

Além disso, este evento também pode ser observado na estrutura das histonas (proteínas associadas às moléculas de DNA e que determinam o grau de compactação da cromatina). Uma vez adicionado o radical metila nas citosinas, ocorre a desacetilação das histonas, tornando a cromatina mais condensada e, portanto inacessível à maquinaria de transcrição. Outra função normal desse tipo de alteração epigenética é a proteção do genoma do hospedeiro frente a sequências de DNA pertencentes a outros organismos, como por exemplo o DNA de origem viral, que podem ser inativadas através da adição de radicais metila.

Por outro lado, existem algumas situações em que a metilação contribui para processos patogênicos, dentre eles o mais amplamente estudado é o câncer. Atualmente, considera-se que a hipermetilação de determinadas regiões do DNA é um fator diretamente relacionado com a formação tumoral. Este evento pode interferir de diversas formas no processo de carcinogênese. Um dos principais exemplos é a metilação de regiões promotoras de genes supressores de tumor. A principal função das proteínas originadas dos genes supressores de tumor é o controle da proliferação celular. Desta forma, a perda deste tipo de regulação está diretamente relacionada aos processos neoplásicos. A hipermetilação da região 5' do gene que codifica para a proteína do retinoblastoma (pRB) é um dos principais exemplos descritos na literatura sobre o silenciamento de um gene supressor de tumor e o processo de carcinogênese. Ainda não estão bem definidos os fatores que levam à metilação de alguns genes apenas em determinados tipos celulares. Sabe-se que células senescentes e/ou que sofreram ação de fatores ambientais, tais como radiação, fumo, exposição a determinados vírus, entre outros aspectos, apresentam maior incidência de hipermetilação em genes associados ao processo neoplásico⁴⁵.

Em tumores do colo uterino, a metilação de diversos genes é descrita. Os principais exemplos são *DcR1/DcR2*, *hTERT*, *p73*, *p16*, *PTEN*, *E-caderina*, *APC*, *MGMT*, *FANCF*, *BRAC1*, *hMLH1*, *RASSF1A*, *DAPK*, *TSLC1*, *FHIT*, *HIC1*, *RARβ*, *TIMP2/TIMP3*, *CAV-1*, *Era*, entre outros. Os resultados destes estudos não determinam um padrão estabelecido de metilação em um amplo grupo de amostras, mas prometem contribuir no prognóstico de tumores do colo uterino^{26,46}.

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA

Existem diversos estudos na literatura que visaram identificar genes diferencialmente expressos entre linhagens imortalizadas/transformadas com HPV ou amostras do colo uterino, utilizando a técnica de *cDNA microarray*. Entre eles, foram comparadas linhagens tumorigênicas e não tumorigênicas HPV16 positivas, com a identificação de 49 genes diferencialmente expressos, como por exemplo o gene C4.8, cuja proteína está associada à proliferação celular e sua expressão encontra-se aumentada em lesões de alto

grau^{47,48}. Outros estudos visaram compor assinaturas gênicas capazes de diferenciar um tecido normal do colo uterino de cânceres de diferentes estádios. Além disso, através destas assinaturas os autores puderam diferenciar carcinomas do colo uterino nos estádios Ib e IIb, além de prever sua resposta à radioterapia⁴⁹. Um estudo comparando o perfil de expressão gênica entre carcinomas cervicais e queratinócitos normais identificou mais de 500 genes diferencialmente expressos, entre eles alguns biomarcadores já descritos em estudos da transformação mediada por HPV, como CDKN2A/ p16^{INK4a}, topoisomerase 2A, entre outros possíveis biomarcadores⁵⁰. Por fim, um estudo identificou como diferencialmente expressos os transcritos da caliceína 7 e da superóxido dismutase 2, quando comparadas linhagens imortalizadas com HPV16 e HPV18 a culturas primárias de queratinócitos normais⁵¹.

ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS

Marcadores circulantes identificados através da técnica SELDI

Estudos recentes utilizaram uma abordagem baseada nos estudos de proteômica, denominada SELDI (*surface enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry*), para identificar biomarcadores circulantes em mulheres com câncer cervical. De fato, essa técnica permite o rastreamento de centenas de proteínas diferencialmente expressas presentes em fluidos corpóreos como plasma, saliva, urina, entre outros. Alguns estudos descrevem perfis de proteínas plasmáticas capazes de discriminar pacientes com e sem câncer do colo uterino, com sensibilidade e especificidade que variam de 87 a 92% e 97 a 100%, respectivamente^{52,53}. Estes estudos ainda não são conclusivos, mas prometem identificar proteínas circulantes diferencialmente expressas quando comparados soros de mulheres que possuem ou não o câncer do colo uterino.

Além disso, outros marcadores circulantes foram analisados para detectar este tipo de câncer, entre eles as proteínas IGF-2, VEGF-C e o CIFRA⁵⁴⁻⁵⁶. Recentemente, a metilação dos genes CDH1 e CDH2 foi analisada em amostras séricas⁵⁷. Vale ressaltar que estes marcadores ainda estão em estudo e necessitam de avaliações adicionais.

Resposta humoral contra o HPV

A análise de anticorpos circulantes contra os antígenos do HPV não é utilizada como ferramenta na triagem de câncer cervical, uma vez que não existem testes padronizados com esta finalidade. Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem uma ampla avaliação dos antígenos de HPV abre novas possibilidades para sua utilização, não apenas no rastreamento de lesões e câncer do colo uterino associados ao HPV, como também no monitoramento pós-aplicação de vacinas profiláticas^{12,58,59}.

Marcadores circulantes adicionais com potencial utilização na clínica

Na literatura são citados apenas três possíveis marcadores que podem contribuir na clínica para a complementação do seguimen-

to da paciente após o tratamento do câncer cervical^{60,61}. Para carcinomas epidermóides, o antígeno de carcinomas de células escamosas (SCCA) é o mais indicado. Esta proteína é uma subfração de TA-4, um antígeno associado a tumores e que pertence à família dos inibidores de serino-proteases. Na maioria dos estudos, o SCCA total é mensurado para determinar a conduta clínica, entretanto sua utilização ainda se encontra repleta de controvérsias. Níveis séricos de SCCA foram correlacionados com o estágio e tamanho tumoral, o tumor residual após tratamento, doença recorrente ou em progressão e sobrevida em pacientes com carcinomas epidermóides. Vale a pena ressaltar que este marcador não é suficientemente sensível para detectar 100% das lesões precursoras e avançadas do colo uterino. Aproximadamente 60% das mulheres com lesões precursoras do colo uterino apresentam níveis significativos deste marcador. Além disso, níveis elevados desta proteína são detectados em outros tipos tumorais, como por exemplo, carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, esôfago e pulmão^{62,63}. Além deste marcador, o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o CA125 têm sido utilizados com cautela em pacientes com adenocarcinomas do colo uterino, mas até o presente momento não existem condutas estabelecidas utilizando estes marcadores. Vale a pena ressaltar que apesar dos inúmeros esforços na procura de marcadores circulantes, nenhum deles mostrou utilidade clínica comparável ou superior às análises realizadas diretamente nos esfregaços derivados do colo uterino.

CONCLUSÃO

Atualmente, além do teste de Papanicolaou, diversos biomarcadores associados ao câncer cervical estão sendo analisados. Os dados mais contundentes são associados à detecção persistente do genoma de HPV de alto risco. Além disso, tanto o estudo da expressão de p16^{INK4a} através de imunoistoquímica, como a avaliação dos transcritos de E6/E7 dos HPV do tipo 16, 18, 31, 33 e 45 em amostras do colo uterino, têm-se tornado bastante populares entre os citopatologistas e os colposcopistas. Outros biomarcadores possuem um elevado potencial, mas como ainda não foram avaliados em grandes ensaios clínicos, perdem sua possível utilização na prática clínica. Considerando a rápida evolução e o aprimoramento de técnicas e estudos que permitem analisar modificações e alterações celulares em larga escala, acredita-se que a análise simultânea utilizando diversos biomarcadores possa contribuir para a determinação de sua eficiência em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol* 2001; 2(11): 698-704.
2. Zur-Hausen H. Pappilomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5): 342-350.
3. INCA – Instituto Nacional de Câncer. <http://www.inca.gov.br>. Acessado em: 15/03/09.
4. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26(10): 1-16.
5. IARC - International Agency for Research on Cancer-World Health Organization. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses. Lyon: Human papillomavirus 2007. Vol. 90. Available from: URL:<http://www-dep.iarc.fr/>. Acessado em: 15/03/09.
6. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuid A et al. GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group. Efficacy of a bivalent L1

- virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9447): 1757-65.
7. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM et al. HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006; 367(9518): 1247-55.
 8. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005; 6(5): 271-8.
 9. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S et al. Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 2007; 356(19): 1928-43.
 10. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006; 95:1459-1466.
 11. Schwarz TF, Leo O. Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: improving upon nature. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 1-10.
 12. Lepique AP, Rabachini T, Villa LL. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(1): 1-10.
 13. Spitzer M, Apgar BS, Brotzman GL. Management of histologic abnormalities of the cervix. *Am Fam Physician* 2006; 73(1): 105-12.
 14. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twigg LB, Wilkinson EJ; American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1):295-304.
 15. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16):2114-9.
 16. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103(2): 304-9.
 17. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* 2006; 3: 63-70.
 18. Koss LG. Testing in cervicovaginal cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(1): 13.
 19. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38(17): 2229-42.
 20. Sasieni PD, Cuzick J, Lynch-Farmery E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer* 1996; 73(8): 1001-5.
 21. Duarte-Franco E, Franco EL. Cancer of the Uterine Cervix. *BMC Womens Health* 2004; 4:S13.
 22. von Knebel-Doeberitz M, Syrjanen KJ. Molecular markers: how to apply in practice. *Gynecol Oncol* 2006; 103(1): 18-20.
 23. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006; 3: 78-89.
 24. Castellsagué X, Sanjosé S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, et al. HPV and Cervical Cancer in the World 2007 Report. *Vaccine* 2007; 25:3.
 25. Solomon D, Schiffman M, Tarone R; ALTS Study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 293-9.
 26. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007; 23(4): 315-30.
 27. Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471(2): M81-8.
 28. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of do colo uterino cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 2005; 4:38.
 29. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(9): 4350-4.
 30. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer* 2005; 105(6): 461-7.
 31. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(8): 1355-60.
 32. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2): 276-84.
 33. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153(6): 1741-8.
 34. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2007; 24:7-4.
 35. Duensing S, Duensing A, Flores ER, Do A, Lambert PF, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* 2001; 75(16): 7712-6.
 36. Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002; 62(23): 7075-82.
 37. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 2002; 21(3): 419-26.
 38. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 886-91.
 39. Vinokurova S, Wentzensen N, Eienkel J, Klaes R, Ziegert C, Melsheimer P et al. Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(24): 1816-21.
 40. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 21(6682): 229-34.
 41. Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(1): 11-22.
 42. Brenna SM, Silva ID, Zeferino LC, Pereira JS, Martinez EZ, Syrjanen KJ. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive do colo uterino cancer in Brazil. *Gynecol Oncol* 2004; 93(2): 374-80.
 43. Maki H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R et al. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87(4): 528-33.
 44. Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC et al. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 1998; 10(6711): 531-2.
 45. Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Dem A, Sow PS, Dembele B et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from patients with cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(6): 1178-84.
 46. Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Tsang PC, Ngan HY. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer* 2006; 6: 212.
 47. Nees M, van Wijngaarden E, Bakos E, Schneider A, Durst M. Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. *Oncogene* 1998; 16(19): 2447-58.
 48. Wollscheid V, Kuhne-Heid R, Stein I, Jansen L, Köllner S, Schneider A et al. Identification of a new proliferation-associated protein NET-1/C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 99(6): 771-5.
 49. Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, Hu R et al. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res* 2003; 9(15): 5486-92.
 50. Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cané S, Bellone S et al. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005; 331(2): 269-91.
 51. Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R Jr, Martins WK, Colo AE et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics* 2008; 1:29.

52. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Wang VW, Chan CS, Ng TB et al. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett* 2004; 211(2): 227-34.
53. Lin YW, Lai HC, Lin CY, Chiou JY, Shui HA, Chang CC et al. Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(3): 1216-24.
54. Mathur SP, Mathur RS, Gray EA, Lane D, Underwood PG, Kohler M et al. Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: Relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-A. *Gynecol Oncol* 2005; 98(3): 467-83.
55. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005; 103(4): 724-30.
56. Molina R, Filella X, Augé JM, Bosch E, Torne A, Pahisa J et al. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. *Anticancer Res* 2005; 25(3A): 1765-71.
57. Widschwendter A, Ivarsson L, Blassnig A, Muller HM, Fiegl H, Wiedemair A et al. CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 109(2): 163-6.
58. Silins I, Avall-Lundqvist E, Tadesse A, Jansen KU, Stendahl U, Lenner P et al. Evaluation of antibodies to human papillomavirus as prognostic markers in cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2002; 85(2): 333-8.
59. Waterboer T, Sehr P, Michael KM, Franceschi S, Nieland JD, Joos TO et al. Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins. *Clin Chem* 2005; 51(10): 1845-53.
60. Gaarenstroom KN., Bonfrer JMG. National Academy of Clinical Biochemistry - Guidelines for the Use of Tumor Markers in Cervical Cancer. (Section 3J). 2006, 1-16. <http://www.aacc.org/>. Acessado em: 15/03/09.
61. Diamandis EP, Hoffman BR, Sturgeon CM. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for the Use of Tumor Markers. *Clin Chem*. 2008; 54(11): 1935-9.
62. Esajas MD, Duk JM, de Bruijn HW, Aalders JG, Willemse PH, Sluiter W et al. Clinical value of routine serum squamous cell carcinoma antigen in follow-up of patients with early-stage cervical cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(19): 3960-6.
63. Hsu KF, Huang SC, Shiauz AI, Chengy YM, Shenk MR, Chenk VF et al. Increased expression level of squamous cell carcinoma antigen 2 and 1 ratio is associated with poor prognosis in early-stage uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 174-181.

Endereço para correspondência:**LUISALINA VILLA**

Ludwig Institute for Cancer Research - São Paulo Branch - Hospital Alemão Oswaldo Cruz;

Rua João Julião, 245 - 1º andar, São Paulo, SP, Brasil.

CEP: 01323-930.

Telefone: 55(11) 3549-0461

E-mail: llvilla@ludwig.org.br

Recebido em: 28/01/09

Aprovado em: 22/02/09