

O PAPEL DO GENE p16 E DO GENE DAPK NO CONTROLE DO CICLO CELULAR E NA VIA DA CARCINOGENESE VULVAR

THE ROLE OF p16 AND DAPK GENES IN CELL CYCLE CONTROL AND IN THE PATHWAYS OF VULVAR CARCINOGENESIS

Susana Aidé¹, Fernanda Lattario², Isabel Cristina C Val¹, Gutemberg Almeida¹,
Maria da Gloria C Carvalho²

RESUMO

O câncer vulvar é o quarto tipo de câncer mais comum nas mulheres e representa 4,8% dos cânceres do trato genital inferior. O carcinoma de células escamosas é responsável por 80 a 90% de todos os cânceres de vulva. O carcinoma escamoso vulvar e suas lesões pré-malignas parecem desenvolver-se por dois caminhos distintos, baseados em características etiológicas e histopatológicas, tendo assim uma etiologia heterogênea. Um dos caminhos está relacionado com a infecção pelo HPV, e o outro, com as desordens epiteliais, tais como líquen escleroso e hiperplasia epitelial. O HPV é um importante fator causal das neoplasias do trato genital inferior. Ele está presente em cerca de 90% dos cânceres do colo uterino e 30 a 40% dos cânceres de vulva. O tipo mais prevalente é o 16, seguido pelos tipos 18, 45, 31 e 33. O estudo das alterações genéticas e epigenéticas, por meio da análise de metilação e imunexpressão gênica, tem demonstrado uma grande versatilidade para o monitoramento molecular de pacientes com câncer, o que impulsiona pesquisas de métodos diagnósticos e terapêuticos do câncer. Nesta atualização pretendeu-se demonstrar as funções dos genes p16 e DAPK e as recentes pesquisas sobre a expressão destes genes nas vias da carcinogênese vulvar.

Palavras-chave: câncer vulvar, HPV, líquen escleroso, gene p16, gene DAPK, DST

ABSTRACT

Vulvar cancer is the fourth commonest kind of cancer in women and it represents 4.8% of cancers in the lower genital tract squamous cell carcinoma is responsible for 80-90% of all vulvar cancers. Squamous cell carcinoma and its premalignant lesions seem to develop in two distinct pathways, based on etiological and histopathological characteristics, thus forming a heterogeneous etiology. Whereas one of the pathways is related to HPV infection, the other is related to epithelial disorders such as: lichen sclerosus and epithelial hyperplasia. HPV is an important contributing factor of neoplasia in the lower genital tract. It is found in 90% of cervical cancers and in 30-40 % of vulvar cancers. The most prevalent kind is 16, followed by 18, 45, 31, and 33. The study of genetic and epigenetic alterations by means of methylation and genic immunexpression has demonstrated great versatility to the monitoring of patients with cancer, which boosts researches of diagnostic and therapeutic methods for cancer. This update intends to demonstrate the role of p16 and DAPK genes as well as the recent researches regarding the expression of these genes in the pathways of vulvar carcinogenesis.

Keywords: vulvar cancer, HPV, lichen sclerosus, p16 gene, DAPK gene, STD

INTRODUÇÃO

O câncer vulvar é o quarto tipo de câncer mais comum nas mulheres. Nos Estados Unidos da América (EUA), em 2004, segundo a Sociedade Americana de Câncer, 3.970 novos casos da doença foram diagnosticados, representando 4,8% dos cânceres do trato genital inferior¹. A mesma sociedade disponibiliza em página na internet a informação de que houve 3.460 novos casos em 2008 nos EUA. O aumento da incidência do câncer vulvar em função da idade foi de aproximadamente 2/100.000 para 25/100.000 após os 75 anos². Alguns fatores de risco são relacionados, como fumo, líquen escleroso vulvar (LE), hiperplasia epitelial vulvar, neoplasia intraepitelial vulvar (NIV), infecção pelo HPV (papilomavírus humano), síndrome de imunodeficiência, histórico de câncer cervical e ancestralidade norte-europeia. O carcinoma de células escamosas é responsável por 80 a 90% de todos os cânceres de vulva e 3 a 4% de todos os cânceres ginecológicos³.

As alterações epigenéticas, assim como as alterações genéticas, estão envolvidas no desenvolvimento e na progressão do câncer⁴.

O estudo dessas alterações, por meio da análise da metilação e da imunexpressão gênica, tem demonstrado uma grande versatilidade para o monitoramento molecular de pacientes com câncer, o que impulsiona pesquisas de métodos diagnósticos e terapêuticos do câncer⁵. Nesta atualização pretendeu-se demonstrar as funções dos genes p16 e DAPK (proteína cinase associada à morte) e as recentes pesquisas sobre a expressão desses genes nas vias da carcinogênese vulvar.

Vias da carcinogênese vulvar

O carcinoma escamoso vulvar e suas lesões pré-malignas parecem desenvolver-se por dois caminhos distintos, baseados em características etiológicas e histopatológicas, tendo assim uma etiologia heterogênea. O primeiro caminho leva principalmente a carcinomas (basaloides e/ou verrucosos) não queratinizantes e afeta, prioritariamente, mulheres jovens. Nesse caminho, a infecção pelo HPV oncogênico está envolvida, predominando o tipo 16, ainda que sejam detectados os tipos 18, 45, 31 e 33. A lesão pré-maligna associada é a NIV basalóide e/ou verrucosa, usualmente chamada de “clássica” ou bowenoide¹. Na nova nomenclatura recentemente proposta pela Sociedade Internacional do Estudo de Doenças Vulvovaginais, as lesões de NIV positivas para o HPV são

¹Instituto de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

chamadas NIV tipo usual⁶. Em geral são multifocais, aparentam ter um prognóstico melhor do que nos casos de ausência do HPV e são responsáveis por 30 a 40% dos casos de câncer vulvar.

O segundo caminho raramente se associa à infecção pelo HPV, ocorre em mulheres mais idosas, é, em geral, unifocal e leva ao carcinoma de células escamosas queratinizante, partindo de um ambiente de distúrbios epiteliais não neoplásicos, como o líquen escleroso, a hiperplasia epitelial, o processo inflamatório crônico e até da pele vulvar normal. É responsável por 60% dos casos de câncer vulvar. Sua possível forma precursora é conhecida como NIV diferenciada.

É bem estabelecido que a infecção pelo HPV de alto risco tem um papel essencial na carcinogênese de tumores do trato genital inferior. O desenvolvimento do câncer é o resultado de um complexo mecanismo no qual as proteínas oncogênicas virais E6 e E7 bloqueiam as proteínas regulatórias, especialmente a p53 e a pRb (retinoblastoma), produzidas por genes supressores de tumor¹.

Com o tratamento, a chance de malignização do LE encontra-se entre 4 e 6%, isto é, suspeita-se, mas sem comprovação, que o controle dos sintomas pode ter um efeito protetor na malignização⁷. Entretanto, em mais de 60% dos casos de câncer vulvar há presença de LE nas margens da lesão⁸.

A inflamação crônica parece atuar com importante papel, mas a exata patogênese da progressão maligna não está estabelecida. O perfil imunogenético, a alta expressão da proteína p53 e a presença da hiperplasia podem fazer parte dos determinantes para a transformação maligna⁷.

Em estudo recente, van der Avoort *et al.* pesquisaram os dois caminhos do carcinoma escamoso vulvar. Eles detectaram a presença do HPV, principalmente do tipo 16, nas lesões de NIV tipo usual (em três de sete lesões clássicas de NIV II – 43%, e em 12 de 17 lesões clássicas de NIV III – 71%), em somente uma entre as oito lesões de NIV diferenciada e em nenhuma amostra de carcinoma de células escamosas e de líquen escleroso.

Segundo Raspollini *et al.*, séries de casos de carcinoma de células escamosas excisados não reportam a NIV adjacente em um alto percentual dos casos. Tumores invasivos podem substituir lesões precursoras como a NIV, mas talvez exista a possibilidade de o carcinoma escamoso vulvar surgir diretamente do LE ou da hiperplasia epitelial sem qualquer evidência morfológica de células atípicas. A média de intervalo de surgimento do câncer vulvar a partir do líquen escleroso é em torno de 10 anos^{2,9}.

Metilação

O caminho da malignização provavelmente resulta de uma série de acúmulos de alterações genéticas e epigenéticas⁴. A mutação representa uma alteração genética em que há modificação na sequência genômica do DNA (ácido desoxirribonucleico) resultando em inativação do seu produto (proteína). As alterações epigenéticas têm-se estabelecido como um dos sinais moleculares mais importantes dos tumores em humanos, podendo causar lesões em genes que têm importância-chave no desenvolvimento do câncer, como os genes envolvidos em reparo de DNA, apoptose, aderência e ciclo celular¹⁰.

A metilação representa o principal fenômeno epigenético pelo qual um gene é silenciado. A metilação do DNA é uma modifica-

ção química, epigenética, pós-duplicação, mediada por enzimas, na qual são adicionados radicais metil (CH_3) em regiões específicas (nucleotídeos) do DNA. Este processo está associado ao controle da expressão gênica,¹¹ ao controle da recombinação gênica e a um mecanismo de defesa contra DNA exógenos que invadem o genoma¹². A metilação é considerada epigenética porque, apesar de afetar a estrutura do DNA, não altera definitivamente o código genético, isto é, não produz efeito no pareamento de bases,¹³ podendo retornar a sua funcionabilidade normal com o uso de agentes demetilantes^{14,15}. Em humanos, a metilação no DNA ocorre comumente em citosinas (C) seguidas de guaninas (G), conhecidas como ilhas CpG (citosina e guanina na região promotora). Mais da metade dessas ilhas são metiladas¹⁶ e encontram-se na região promotora dos genes, que são sequências regulatórias situadas na extremidade 5' do DNA logo antes do sítio de transcrição gênica¹⁷. A metilação é mediada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT), que catalisam a adição de um grupamento metil doado pelo S-adenosilmetionina (SAM) à citosina nos dinucleotídeos CpG (**Figura 1**).

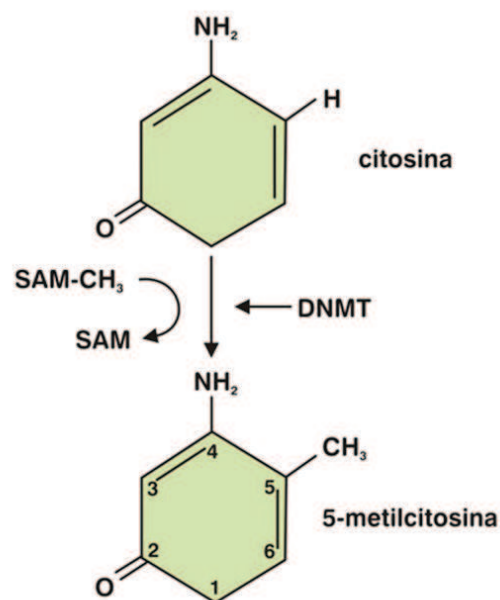


Figura 1 – Mecanismo de metilação do DNA. A 5-metilcitosina é produzida pela ação da DNA-metiltransferase (DNMT1, 3a ou 3b), que catalisa a transferência de um radical metil (CH_3) da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono da posição 5 da citosina¹³.

É possível encontrar inativação simultânea de vários caminhos pela metilação aberrante comprometendo todas as funções gênicas. O silenciamento transcricional dos genes supressores de tumor pela hipermetilação das ilhas CpG na região promotora é um dos principais mecanismos de inativação gênica e possivelmente resulta em perda do controle do crescimento celular e contribui para a carcinogênese^{4,11} (**Figura 2**).

Alguns trabalhos analisam a função gênica por meio da técnica do bissulfito, que verifica a presença ou não da metilação gênica. Outros estudos avaliam a imunoproteína, produto gênico, pela técnica de imuno-histoquímica.

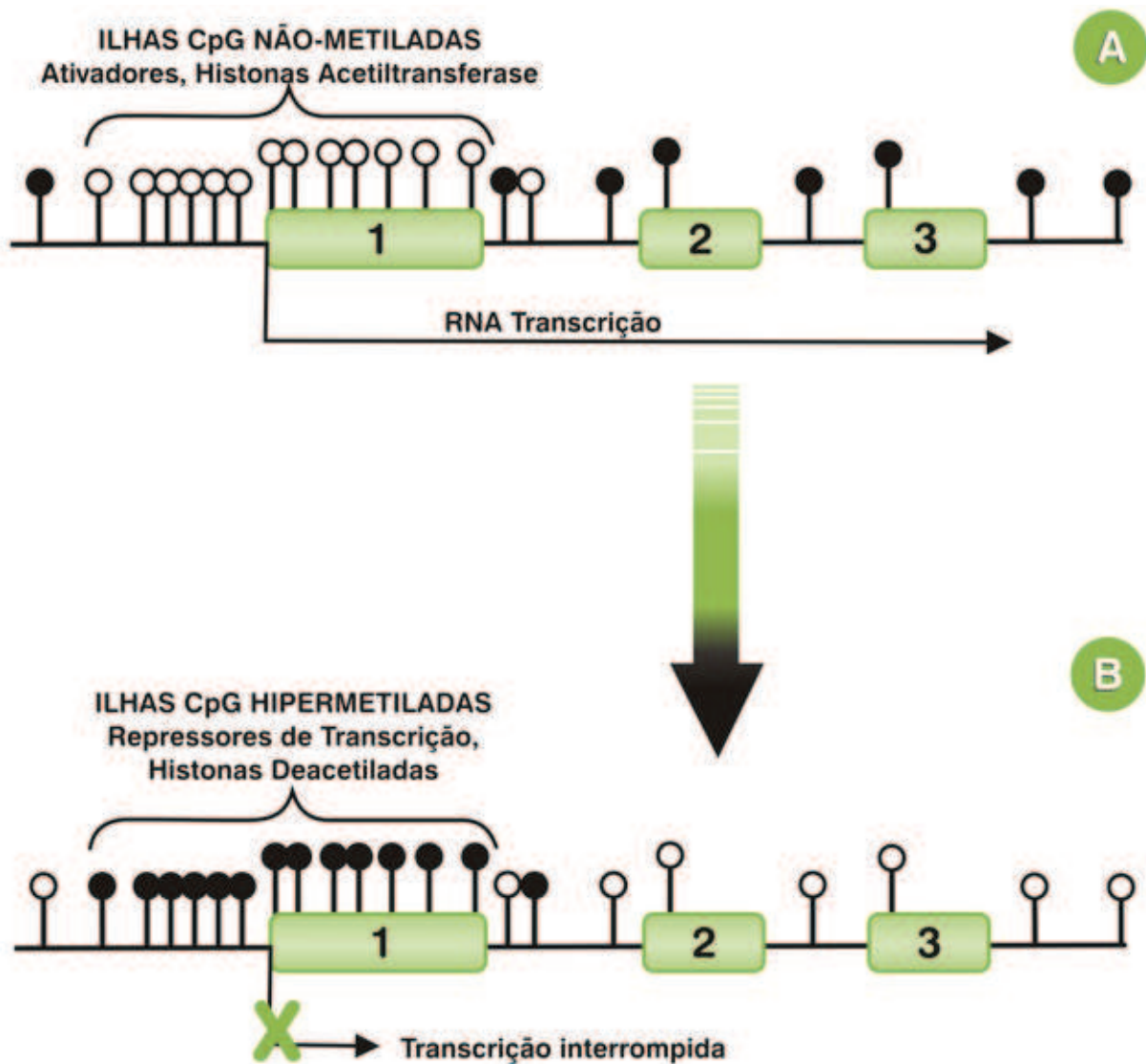


Figura 2 - Ilha CpG típica de um gene supressor de tumor representada numa célula normal (A) e em uma tumoral (B). As bolinhas brancas representam CpG não metiladas; e as bolinhas pretas, CpG metiladas⁵.

Proto-oncogenes, oncogenes e genes supressores de tumor

A análise das alterações genéticas em células cancerosas revelou um grande número de genes que codificam proteínas envolvidas no controle da proliferação celular. Esses genes podem ser classificados em genes de proliferação e genes de antiproliferação. Os proliferativos ou proto-oncogenes são aqueles que promovem o crescimento celular, a organização do sistema-controle do ciclo celular e fazem com que a célula ultrapasse o ponto de checagem G1¹⁸. Quando mutados, são denominados oncogenes. Os oncogenes provocam uma proliferação anormal das células, o que é uma característica essencial dos cânceres¹⁹. Em outro grupo, encontram-se os genes classificados como antiproliferativos ou antioncogenes, que impedem o desenvolvimento do ciclo celular. O mais bem estudado é o gene do retinoblastoma (Rb). Quando esses genes estão modificados ou ausentes, seu efeito é suprimido, e o crescimento celular desenvolve-se de forma anormal; são denominados genes

supressores tumorais, e entre estes estão o p53 e o p16²⁰. Além disso, há genes relacionados com a morte celular programada (apoptose), como o próprio p53 e o DAPK.

Ciclo celular

O ciclo celular compreende uma série de processos que uma célula precisa efetuar para alcançar a divisão celular. Todos esses processos são coordenados por um sistema-controle do ciclo celular¹⁸.

O ciclo celular é dividido em fases distintas, das quais a mais dramática é a mitose (ou meiose), processo de divisão nuclear, culminando com o momento de divisão celular propriamente dito ou fase M. A replicação do DNA nuclear ocupa somente uma parte da interfase, chamada fase S do ciclo celular (S = síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1 (G = *gap* ou lacuna), e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é chamado de fase G2. As fases

G1 e G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular. Durante a fase G1 a célula monitora seu próprio crescimento e tamanho. No momento oportuno, a célula decide sobre seu comprometimento com a replicação de DNA e a conclusão de um ciclo de divisão¹⁸. Nessa fase, o RNA (ácido ribonucleico) e proteínas são sintetizados, ainda não havendo replicação do DNA²¹. A fase G2 fornece um intervalo de segurança, de maneira que a célula possa assegurar uma completa replicação de DNA antes de iniciar a mitose¹⁸. Durante essa fase, o conteúdo total de DNA aumenta do valor diploide (2n) para o valor tetraploide (4n)²¹. As fases G1, S, G2 e M são as subdivisões do ciclo celular padrão. (**Figura 3**).

Uma vez no ciclo, as células têm três caminhos a seguir: permanecer no ciclo, seguindo para divisões sucessivas; sair do ciclo, continuar vivas e entrar na fase G₀; ou morrer por apoptose²². Há dois pontos no ciclo celular denominados pontos de checagem, importantes para a decisão a ser tomada em relação à continuação ou parada no ciclo. O comprometimento para a replicação cromossômica nas células animais ocorre na fase G₁ e é denominado ponto de checagem G₁. O comprometimento para a divisão mitótica ocorre no final da fase G₂ (transição para M) e é denominado ponto de checagem G₂. Esses pontos de checagem são importantes porque permitem o controle do sistema por sinais do meio externo.

Se houver alguma falha no DNA, genes envolvidos na regulação do ciclo celular, entre eles o p53, o p16 e o DAPK, serão ativados,^{23,24} fazendo com que a célula, ao chegar ao ponto de checagem G₁ ou G₂, seja induzida à morte programada (apoptose) ou à parada na fase G₀, até que condições ambientais favoráveis apareçam ou que o DNA danificado seja reparado²⁵.

O gene p53, localizado no cromossoma 17, codifica a proteína p53 e está envolvido em processos celulares incluindo regulação do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA, diferenciação celular e angiogênese²¹. A sua inativação funcional representa uma das anormalidades genéticas mais frequentemente encontradas em neoplasias humanas, pois promove a perda da capacidade de suprimir o crescimento de células anormais, permitindo a sobrevivência de células com DNA danificados que continuarão a replicar-se.

A mutação do gene p53 tem sido reconhecida como o evento mais precoce nos tumores invasivos de células escamosas da pele. Vanin *et al.*, analisando a superexpressão da p53 em LE adjacente ao câncer vulvar, observaram a presença da mutação no carcinoma vulvar. De acordo com Rolfe *et al.*, a mutação do gene p53 tem um importante papel na progressão do LE para o carcinoma escamoso vulvar.

Gene p16

O gene p16 está localizado na região cromossômica 9p21 e possui três exons, sendo o exon 1 constituído por 126 pb (pares de base); o exon 2, por 307 pb; e o exon 3, por 11 pb. O gene p16 codifica uma proteína de 16 kDa, que atua como inibidora da cinase dependente de ciclina (CdK), mantendo a proteína retinoblastoma (Rb) em um estado hipofosforilado e controlando negativamente a progressão do ciclo celular na passagem das fases de G1 para S (síntese)²⁸⁻³⁰.

Um ponto-chave no qual as células decidem replicar seu DNA e entrar em um ciclo de divisão celular é controlado pela proteína retinoblastoma (pRb), o produto do gene supressor de tumor Rb. A pRb serve como um freio que limita a entrada na fase S, ao ligar-se às proteínas reguladoras de genes, as E2F, que são necessárias para expressar os genes cujos produtos são imprescindíveis para o prosseguimento do ciclo celular; isto é, a E2F liga-se a sequências específicas do DNA nos promotores de genes que codificam proteínas necessárias para a entrada na fase S, como a G1-ciclina e a S-ciclina.

Durante a fase G1, a pRb liga-se à E2F e bloqueia a transcrição dos genes da fase S. Quando as células são estimuladas a se dividir pelos sinais extracelulares, a p16 para de bloquear o complexo G1-CdK, que, ativo, fosforila a pRb, reduzindo a afinidade desta pela E2F. A pRb dissocia-se, permitindo que a E2F ative a expressão dos genes da fase S e ocorra a transcrição^{18,31} (**Figura 4**).

A inativação do gene p16, que pode ocorrer por deleção, mutação ou metilação, é comum em muitas formas de cânceres humanos. A metilação do gene p16 está associada à perda da expressão de sua proteína³² e parece ser um evento precoce na carcinogênese vulvar³³.

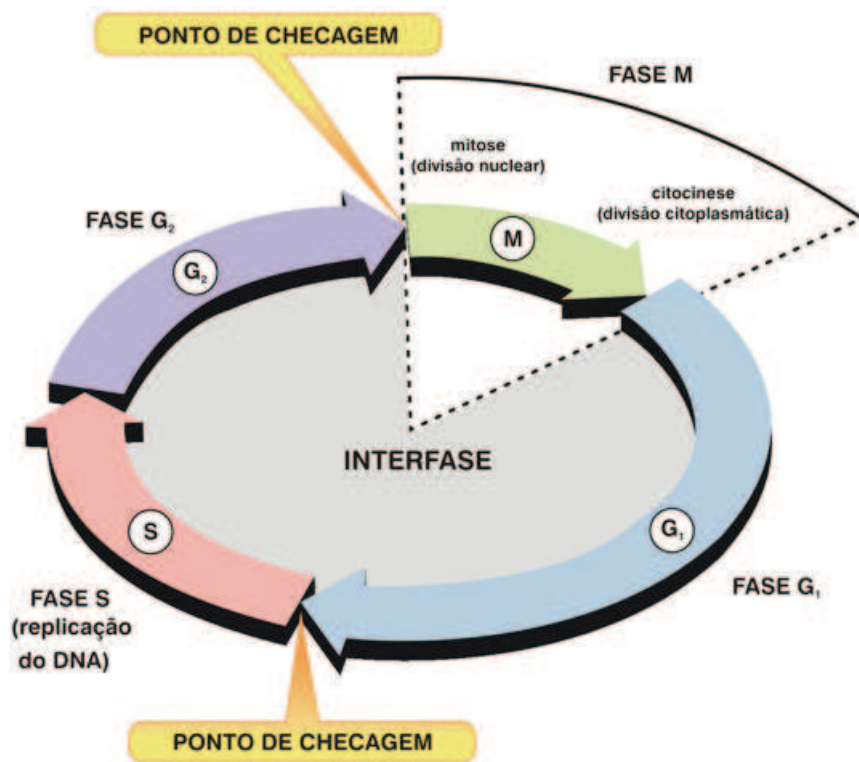


Figura 3 – As quatro fases sucessivas de um ciclo-padrão de uma célula eucariótica (adaptada de Albert *et al.*, 2004).

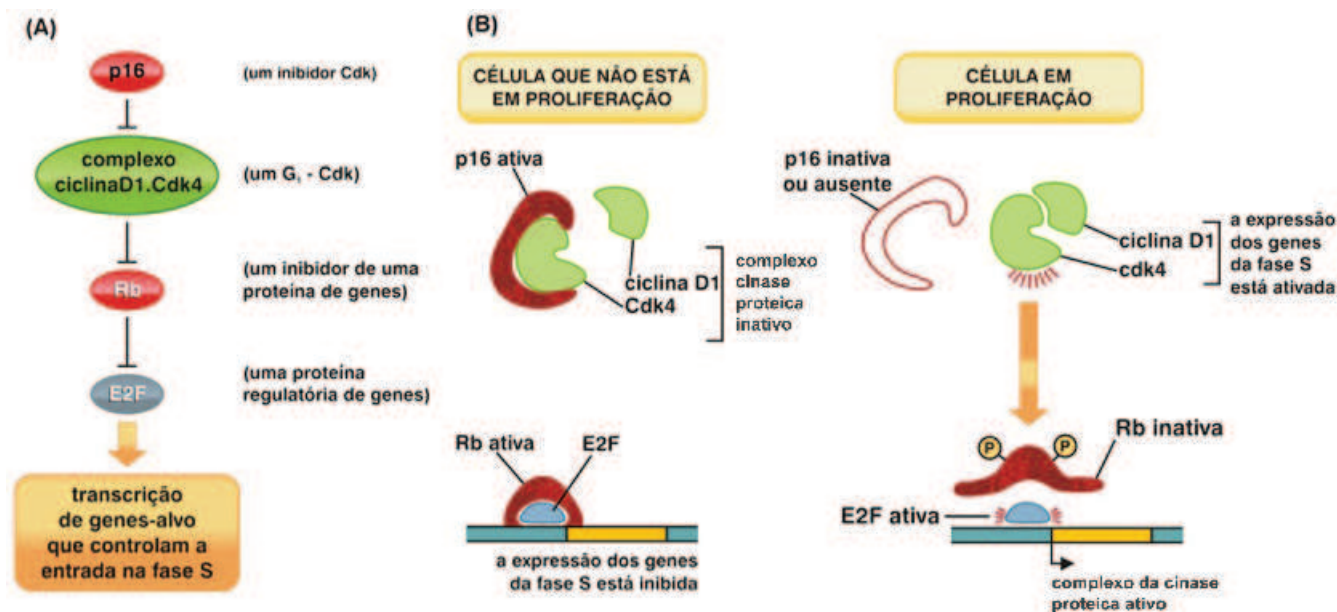


Figura 4 – A via que controla o ciclo celular por meio da proteína p16 (adaptada de Albert *et al.*, 2004).

Em nosso meio, a metilação do gene p16 foi estudada no líquen escleroso vulvar, pela técnica do bissulfito, para modificação do DNA e amplificação do produto pela PCR (reação em cadeia da polimerase), e apresentou metilação em 35% (8/23) dos casos.

Jerma *et al.*, por meio da técnica do bissulfito para modificação do DNA e amplificação do produto pela PCR, detectaram a presença da metilação do gene p16 em 42,8% (9/21) dos casos estudados de LE. Pela técnica de imuno-histoquímica, os autores não evidenciaram alterações na expressão imuno-histoquímica da pRb e da ciclina-D1 no LE, ao contrário do que foi notado nos casos de carcinoma vulvar. Segundo os autores, a metilação do gene p16 representa um evento precoce no LE, na NIV e no câncer vulvar. A superexpressão da ciclina-D1 ocorre em estágios mais avançados da carcinogênese vulvar (NIV e câncer vulvar), e a perda da expressão da pRb surge como um evento tardio, não participando da transformação maligna, somente presente no câncer vulvar. Assim sendo, a perda da função dos genes p16 e Rb em tempos distintos pode ter dois diferentes efeitos: a alteração de qualquer um dos genes é suficiente para romper o ciclo celular na fase de transição entre as fases G1 e S no ponto de checagem, ou mudanças na expressão de um deles podem ser compensadas pelo outro, mantendo o efeito inibitório do crescimento celular.

Em contraste, foi observado em estudos prévios que, nos casos de câncer cervical e vulvar induzidos pela infecção causada pelo HPV oncogênico, a proteína p16 frequentemente se mostrou superexpressa. Quando o HPV se integra ao genoma da célula hospedeira, há um rompimento do genoma viral entre E1/E2. Com isso, há perda da função da proteína E2, que é a proteína regulatória das oncoproteínas virais, E6 e E7. Essas oncoproteínas contribuem para a transformação maligna, por interferirem na regulação do ciclo celular envolvendo a p16. Há degradação da proteína p53 pela oncoproteína E6 e inativação funcional da proteína pRb por meio do bloqueio da E7. Subsequentemente, há ativação da região promotora de genes envolvidos na síntese de DNA e na progressão

do ciclo celular, resultando na recíproca superexpressão da p16, naturalmente uma reguladora negativa do ciclo celular³⁴.

A expressão da proteína p16 nos tumores positivos para HPV oncogênico, principalmente o tipo 16, indica que a mutação do gene p16 não é um evento genético comum nos carcinomas associados ao HPV³⁵. A análise imuno-histoquímica da proteína p16 parece ser um promissor marcador entre o carcinoma vulvar associado e o não associado à infecção viral^{1,35-37}.

Alguns estudos analisaram a expressão proteica da p16 nas lesões que compõem a via da carcinogênese vulvar por meio da técnica de imuno-histoquímica. Riethdorf *et al.* notaram que, no LE, a expressão da p16 mostrou-se positiva, com fraca a moderada intensidade, numa proporção de 42% (5/12) dos casos. A expressão da p16 mostrou-se positiva em 4% (2/48) dos casos de carcinoma escamoso vulvar queratinizante e em 95% (76/80) dos casos de carcinoma basaloide/verrucoso e NIV usual, que também apresentaram positividade para o HPV 16 em 90%. O valor preditivo positivo da p16 imunopositiva e do DNA-HPV positivo para o diagnóstico de carcinoma escamoso basaloide/verrucoso e NIV usual foi de 97% e 95%, respectivamente.

Em estudo de Santos *et al.*, a proteína p16 foi considerada positiva na técnica de imuno-histoquímica quando mais de 25% das células se apresentavam com coloração. A p16 mostrou-se fortemente positiva nos casos de NIV usual e carcinoma basaloide/verrucoso. A p16 foi negativa nos casos de epitélio normal, hiperplasia epitelial, líquen escleroso, NIV diferenciada e em mais de 90% dos casos de carcinoma escamoso queratinizante (dos três casos positivos, um foi em mulher de 25 anos, sugerindo provável envolvimento do HPV, e os outros dois casos foram em mulheres de 85 e 87 anos que tinham um pequeno foco de NIV usual adjacente ao carcinoma). A p16 foi positiva com menos de 5% das células coloridas em 28% dos casos de epitélio normal, 35% de hiperplasia epitelial, 21% de LE e 9% dos casos de carcinoma escamoso queratinizante.

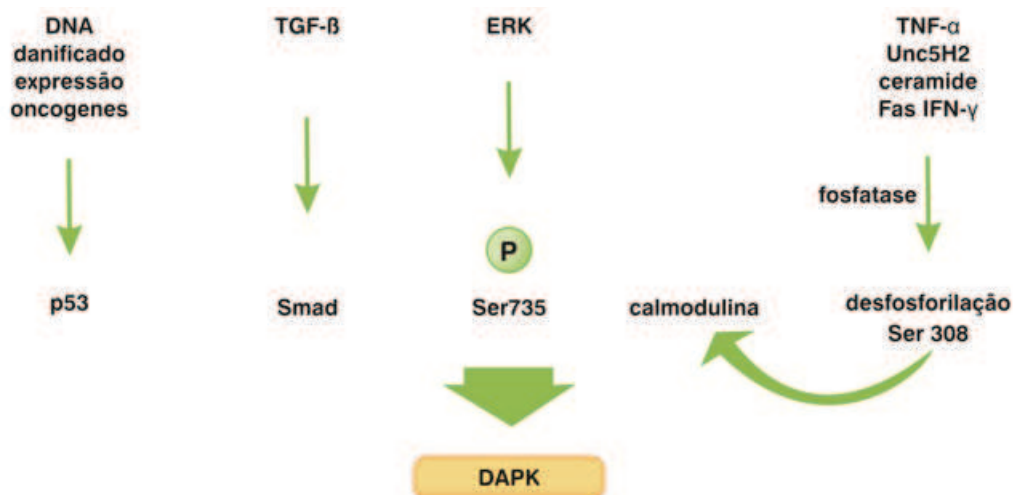


Figura 5 – Vias de estímulo do gene DAPK (baseada em Bialik e Kinchi, 2006).

Van der Avoort *et al.* estudaram os dois caminhos da carcinogênese vulvar por meio de análise da presença do HPV e da expressão da p16. Nas lesões de NIV tipo usual, a expressão da p16 aumentou de acordo com o grau de NIV: na NIV I clássica houve expressão em 60% (3/5); na NIV II clássica, em 71% (5/7), e na NIV III clássica, em 88% (15/17). Todas as lesões de NIV clássica com HPV oncogênico foram acompanhadas pela expressão da p16. Com isso, a expressão da p16 nas lesões de NIV clássica foi mais frequentemente observada na presença do HPV. Nas amostras de carcinoma vulvar, 75% (12/16) não mostraram expressão da p16. Não houve associação estatística significativa entre a expressão da p16 e o nível de diferenciação do carcinoma de células escamosas. Nos casos de líquen escleroso; 40% (4/10) expressaram levemente a p16, e todos os casos foram negativos para o DNA-HPV. Das oito lesões de NIV diferenciada, apenas duas foram levemente positivas para a p16. O caso de NIV diferenciada com presença do HPV oncogênico foi negativo para a expressão da p16. Todos os casos de carcinoma queratinizante de células escamosas foram negativos para o DNA-HPV.

A metilação do gene p16 parece estar presente durante a progressão em outros sítios tumorais, como cervical e gástrico^{4,38-40}.

Gene DAPK

O gene DAPK está localizado no cromossomo 9q34.1 e associado à supressão de tumores por controlar a morte celular e impedir o crescimento de células tumorais, além de ser um supressor de metástases^{24,41}. É encontrado abundantemente no cérebro humano, sobretudo no hipocampo. Pertence à família das cinases e é regulado pelo complexo cálcio/calmodulina²⁴. Ele codifica uma serina/treonina cinase e atua como mediador positivo da apoptose⁴². O gene DAPK está envolvido tanto na via extrínseca como na via intrínseca da apoptose⁴³. Sua expressão é, frequentemente, perdida em tumores humanos por metilação dos dinucleotídeos CpG, encontrados na região promotora²⁴.

O gene DAPK pode ser ativado por vários mecanismos. O DNA danificado e a expressão dos oncogenes estimulam a p53, que é codificada pelo gene regulador negativo do ciclo celular e induz a célula ao estado de repouso (G_0) ou à apoptose. Além da p53, o Smad, um fator transcricional que é estimulado pelo TGF- β (fator transformador de crescimento), também estimula o gene DAPK²⁴. O TGF- β pertence à família de proteínas sinalizadoras com efeito anticrescimento que atuam inibindo o ciclo celular¹⁸. A ERK (cinase regulada por sinal extracelular) é uma proteína que estimula o gene DAPK por meio da fosforilação da serina 735. Certos estímulos de morte, como o TNF- α (fator de necrose tumoral), a proteína Unc5H2, IFN- γ (interferon), ceramide e a proteína ligante Fas, ativam o gene DAPK por desfosforilação da serina 308, catalisada pela fosfatase. Esse processo aumenta a afinidade do gene DAPK pela calmodulina, que também o ativa. Dois fatores são preditivos para ativação do gene DAPK: o aumento do cálcio intracelular mediado pela calmodulina e a desfosforilação da serina 308²⁴.

O gene DAPK acarreta apoptose nas células transformadas por oncogenes, por meio da ativação da p53 no ponto de checagem para apoptose dependente do complexo p19ARF/p53. A p19 é uma proteína inibidora do ciclo celular que se liga e inibe a Mdm2, que, por sua vez, promove a degradação da p53. A ativação da p19, portanto, causa aumentos nos níveis da p53, induzindo a parada do

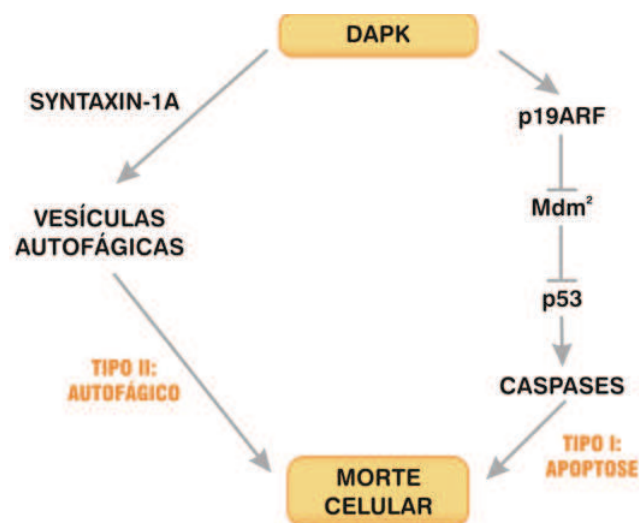


Figura 6 – Vias da morte celular programada (baseada em Bialik e Kinchi, 2006).

ciclo celular ou a apoptose. Na ausência do gene DAPK, parece que a p53 está parcialmente regulada em resposta aos sinais de proliferação. A expressão do gene DAPK induz a p53, portanto o gene DAPK é um gatilho transcricional da p53, que indica a sinalização da alça de *feedback*, quando ambos se ativam. A p53 ativada pelo gene DAPK constitui o clássico caminho de morte celular envolvendo a ativação mitocondrial da cascata de caspases, chamada morte celular tipo I: apoptose²⁴. Uma outra via alternativa de morte celular mediada pelo gene DAPK ocorre com a formação de vesículas autofágicas, o tipo II: autofágico. O substrato responsável por esse caminho parece ser a proteína *syntaxin-1A*. A autofagia resulta na autodigestão das organelas intracelulares. Ambos os tipos de morte celular são regulados pelos mesmos sinais moleculares. (Figuras 5 e 6).

Vários estudos avaliam o estado do gene DAPK em tumores humanos. As pesquisas evidenciam a perda da sua expressão em tipos tumorais, principalmente por meio da metilação do DNA¹¹. Sítios tumorais, como cabeça e pescoço, pulmões, laringe, ânus, cérvix, cólon-reto e estômago apresentaram metilação e consequente silenciamento do gene DAPK^{4,11,39,42-46}.

Com relação ao líquen escleroso vulvar e câncer vulvar, nas bases de dados consultadas não foram encontrados estudos em periódicos científicos sobre a análise da metilação do gene DAPK.

Em nosso meio, a metilação do gene DAPK foi estudada no líquen escleroso vulvar, pela técnica do bissulfito, para modificação do DNA e amplificação do produto pela PCR, e apresentou metilação em 17% (4/23) dos casos. Sendo que em 8% (2/23) houve metilação simultânea dos genes p16 e DAPK.

DISCUSSÃO

Os estudos referentes à funcionabilidade do gene p16 e ao seu papel na via da carcinogênese vulvar sugerem que, na via relacionada com o HPV, isto é, na NIV usual e no carcinoma basalóide/verrucoso, a proteína p16 parece apresentar-se superexpressa, talvez em resposta de defesa à ação viral, uma vez que há a inativação funcional da pRb por meio do bloqueio da oncoproteína E7 do HPV. Já na via do LE vulvar, isto é, na NIV diferenciada e no carcinoma escamoso queratinizante, os dados da literatura descritos não são substanciais quanto à presença da expressão proteica e à presença da metilação do gene como um fator importante na transformação maligna.

A inativação do gene p16 parece estar envolvida, em geral, com processos proliferativos que não estão sempre relacionados com progressão para o câncer; mas que fornecem um evento permissivo que predispõe células a responder com eventos moleculares oncogênicos³².

A perda ou a redução da proteína do gene DAPK, causada pela metilação, parece ser um importante degrau na anulação da apoptose e uma pré-condição para o acúmulo de outras aberrações genéticas. A presença da metilação do gene DAPK na região promotora em tecidos sem neoplasia pode ser interpretada como o aparecimento de lesões pré-malignas que não puderam ser detectadas morfológicamente. A detecção da metilação do gene DAPK parece ser um potencial marcador diagnóstico molecular nos estágios iniciais da carcinogênese⁴⁶.

No estudo em nosso meio, as pacientes com genes metilados e os dois casos descritos com metilação simultânea em ambos os

genes analisados poderão apresentar maior suscetibilidade ao surgimento da NIV diferenciada e câncer vulvar. A prevalência de metilação do gene p16 foi alta (35%) em relação à frequência da evolução para o câncer a partir do LE, descrita na literatura (4-6%), entretanto a porcentagem encontrada de ambos os genes metilados (8,3%) aproxima-se da proporção de malignização da doença. Pode-se sugerir que a metilação do gene p16 seja um evento precoce na via carcinogênica vulvar e que outros eventos, como a presença do gene DAPK metilado, constituam alterações epigenéticas adicionais para a evolução da NIV e, consequentemente, do câncer vulvar. É importante ressaltar que outras modificações genéticas, provavelmente, estão associadas às alterações desses dois genes no caminho da transformação maligna.

A ausência de alterações morfológicas nos casos metilados pode ser justificada pelo fato de o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas ocorrer, paulatinamente, durante anos antes da transformação maligna ou pré-maligna morfológica.

O próprio LE leva, segundo a literatura,^{2,9} em torno de 10 anos para a transformação maligna, que ocorre em torno de 4 a 6% dos casos, e neste período muitas alterações moleculares vão-se somando até sua transformação morfológica. Com isso, a metilação da região promotora dos genes supressores de tumor pode-se tornar um marcador molecular tumoral para o diagnóstico precoce ainda nas células não malignas morfológicamente⁴⁷.

O câncer vulvar tem como uma das principais vias a transformação maligna para NIV a partir do LE vulvar; entretanto o risco de câncer difere entre as portadoras de LE, o que provavelmente reflete diversidade da doença, suscetibilidade da hospedeira ou fatores ambientais. O desenvolvimento de marcadores preditivos para distinguir qual dos casos de LE tem particular risco de câncer vulvar poderá reduzir a mortalidade. A análise da metilação do DNA é uma técnica candidata para a identificação precoce das pacientes com alto risco para desenvolver câncer, tanto na via relacionada com a infecção pelo HPV quanto na via do LE.

Estudos moleculares futuros sobre a via da carcinogênese vulvar poderão elucidar melhor o efeito da metilação gênica no prognóstico e na evolução da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. van der Avoort IAM, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JMM, Hullu JA, Wilde PCM *et al.* Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 25:22-29.
2. Jones RW, Scurry J, Neill S, MacLean AB. Guidelines for follow-up of women with vulvar lichen sclerosus in specialist clinics. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:496.e1-496.e3.
3. Ridley CM, Neill SM. *A Vulva*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2003, p. 302.
4. Kaise M, Yamasaki T, Yonezawa J, Miwa J, Ohta Y, Tajiri H. CpG island hypermethylation of tumor-suppressor genes in *H. pylori*-infected non-neoplastic gastric mucosa is linked with gastric cancer risk. *Helicobacter* 2008; 13:35-41.
5. von Zeidler SV. Prevalência de metilação do gene p16 em população de risco ao câncer bucal. 2003. 78 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2003.
6. Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ, Preti M, Heller DS, Scurry J *et al.* Squamous vulvar intraepithelial neoplasia. 2004 modified terminology, ISSVD vulvar oncology subcommittee. *J Reprod Med* 2005; 50:807-809.

7. van de Nieuwenhof HP, van der Avoort, IAM, Hullu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68:131-156.
8. Leibowitch, M. Neill S, Pelisse M, Moyal-Baracco M. The epithelial changes associated with squamous cell carcinoma of the vulva: a review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. *Br J Obstet Gynecol* 1990; 97:1135-1139.
9. Raspollini MR, Asirelli G, Moncini D, Taddei GL. A comparative analysis of lichen sclerosis of the vulva and lichen sclerosus that evolves to vulvar squamous cell carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:592.e1-592.e5.
10. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis. *TIG* 2000; 16(4):168-174.
11. Kong Wei-Jia, Zhang S, Guo C, Zhang S, Wang Y, Zhang D. Methylation-associated silencing of death-associated protein kinase gene in laryngeal squamous cell cancer. *The Laryngoscope* 2005; 115:1395-1401.
12. Ribeiro FL. Análise da infecção induzida por HPV e EBV e metilação do gene DAPK em células cervicais normais, com lesões precursoras e câncer de colo de útero. 2007. 36 f. Projeto de Tese (Doutorado em Biofísica) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2007.
13. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potencial clinical interventions. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4:1-17.
14. Magdinier F, Wolffe AP. Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4990-4995.
15. McGregor F, Muntoni A, Fleming J, Brown J, Felix DH, MacDonald DG *et al*. Molecular changes associated with oral dysplasia progression and acquisition of immortality: Potencial for its reversal by 5-azacytidine. *Cancer Res* 2002; 62:4757-4766.
16. Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest* 2000; 105:401-407.
17. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9821-9826.
18. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*, 4ªed. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.945-1345.
19. Gompel C, Koss, LG. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. São Paulo: Editora Manole; 1997. p.200.
20. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 623-651.
21. Guimarães ICCV. Neoplasia intra-epitelial vulvar: imunoexpressão da proteína p53, análise da mutação do gene P53 e relação com o HPV em casos de recidiva/progressão. 2001.103 f. Tese (Doutorado em Medicina) Instituto de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2001.
22. Holfstädter F, Knüchel R, Rüschoff J. Cell proliferation assessment in oncology. *Virchow Arch* 1995; 427:323-341.
23. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274:1672-1677.
24. Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function and beyond. *Annual Review in Biochemistry* 2006; 75:189-210.
25. Weinert TA, Hartwell LH. The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1988; 241:317-322.
26. Vanin K *et al*. Overexpression of wild-type 53 in lichen sclerosis adjacent to human papillomavirus-negative vulvar cancer. *J Invest Dermatol* 2002; 119:1027-1033.
27. Rolfe KJ, MacLean AB, Crow JCT. P53 mutations in vulvar lichen sclerosis adjacent to squamous cell carcinoma of the vulva. *Br J Cancer* 2003; 89:2249-2253.
28. Papadimitrakopoulou VA, Hong WK. Biomolecular markers as intermediate end points in chemoprevention trials of upper aerodigestive tract cancer. *Int J Cancer* 2000; 88: 852-855.
29. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA *et al*. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 4519-4524.
30. Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:4938-4944.
31. Huschtscha LI, Reddel RR. p16INK4a and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis* 1999; 20:921-926.
32. Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p 16 gene as an early event in oncogenesis. *PNAS* 1999; 96:12754-12759.
33. Lerma E, Esteller M, Herman JG, Prat J. Alterations of the p16INK4a/Rb/Cyclin-D1 pathway in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and lichen sclerosus. *Hum Pathol* 2002; 33:1120-1125.
34. Tringler B, Grimm C, Dudek G, Zeillinger R, Tempfer C, Speiser P *et al*. p16INK4a expression in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15:279-283.
35. Riethdorf S, Neffen EF, Cviko A, Löning T, Crum CP, Riethdorf L. p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias. *Hum Pathol* 2004; 35:1477-1483.
36. Santos M, Montagut C, Mellado B, García A, Cajal SR, Cardesa A *et al*. Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23:206-214.
37. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suárez H *et al*. P16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1347-1356.
38. Lea JS, Coleman R, Kurien A, Schorge JO, Miller DS, Minna JD *et al*. Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:674-679.
39. Jeong DH, Youm MY, Kim YN, Lee KB, Sung MS, Yoon HK. Promoter methylation of p16, DAPK, CDH1, and TIMP-3 genes in cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1234-1240.
40. Melo YLMF. Presença da metilação do gene p16^{ink4a} e do papilomavírus humano nas lesões intra-epiteliais escamosas cervicais de alto grau. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2007.
41. Inbal B, Sham G, Cohen O, Kissil JL, Kunchi A. Death-Associated Protein Kinase-Related Protein 1, a Novel Serine/Threonine Kinase Involved in Apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1044-1054.
42. Chan AWH, Chan MWY, Lee TL, Ng EKW, Leung WK, Lau JYW *et al*. Promoter hypermethylation of Death-associated protein-kinase gene associated with advance stage gastric cancer. *Oncol Rep* 2005; 13:937-941.
43. Toyooka S, Toyooka KO, Miyajima K, Reddy JL, Toyota M, Sathyanarayana UG *et al*. Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Can Res* 2003; 9:3034-3041.
44. Rosas SLB, Koch W, Carvalho MGC, Wu L, Califano J, Westra W *et al*. Promoter hypermethylation patterns of p16, O⁶-Methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61:939-942.
45. Zhang J, Martinsler ZB, Roemer KL, Kincaid EA, Gustafson KS *et al*. DNA methylation in anal intraepithelial lesions and anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:6544-6549.
46. Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A *et al*. DAPK promoter methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett* 2006; 240:69-75.
47. Reddy AN, Jiang WW, Kim M. Death-associated protein kinase hypermethylation in normal human lymphocytes. *Cancer Res* 2003; 63:7694-7698.

Endereço para correspondência:**SUSANA CRISTINA AIDÉ VIVIANI FIALHO**Rua Doutor Tavares de Macedo, 121/ 602, Icaraí, Niterói, RJ, Brasil.
CEP 24220-215.

E-mail: suaide@oi.com.br

Recebido em: 17/11/2008

Aprovado em: 22/12/2008