Luisa Lina Villa

**Oncogênese por
Papilomavírus Humano (HPV)
Implicações diagnósticas,
prognósticas e preventivas.**

**Texto sistematizado elaborado de forma crítica
para obtenção do título de Professor Livre Docente junto
ao Departamento de Radiologia e Oncologia (área de
Oncologia Básica) da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo**

São Paulo, Agosto de 2013.

Este trabalho é dedicado a tres homens cuja influencia foi decisiva para que eu buscasse o titulo de Livre Docente:

José Carlos da Costa Maia, professor titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que no dia de sua morte, há quase 20 anos, insistiu que eu deveria fazer logo minha docência. Finalmente cumpro a promessa que fizera ao caro professor.

Roger Chammas, professor titular de Oncologia do Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e acolhida no Departamento ao qual ora pertenço. Seus conselhos e firme orientação foram decisivos para minha inclusão na carreira docente.

Fabio Luiz Tuna Vieira, por ter pressentido que eu deveria me submeter a este concurso de título 'o quanto antes'. Sua sabedoria e intuição foram ouvidas e, mais uma vez, me ajudaram muito.

Começamos a entender que o Universo que temos como nosso pode ser considerado como um organismo vivo no qual cada uma das células trabalha em equilibrada cooperação com todas as outras, a fim de manter uma coerência de conjunto. Se uma dessas células falhar e a doença se instalar, esse equilíbrio é posto em questão. É a totalidade do sistema que está em risco. Isso nos sugere que nosso bem-estar individual está intimamente ligado aos outros indivíduos e ao ambiente em que evoluímos.

(Dalai Lama)

SUMÁRIO

Resumo	06
Abstract	07
I – INTRODUÇÃO: UMA FAMÍLIA DE VÍRUS COM CARACTERÍSTICAS ONCOGÊNICAS DIVERSAS	08
II - VARIABILIDADE GENÉTICA E RISCO DE DOENÇA	18
III - HISTÓRIA NATURAL DAS INFECÇÕES POR HPV	23
IV - IMPACTO DAS DOENÇAS POR HPV E SUA PREVENÇÃO	28
V - A BUSCA DE NOVAS MODALIDADES TERAPÊUTICAS	36
VI – CONCLUSÕES	40
Referências Bibliográficas	41
Seleção de trabalhos destacados no texto (ANEXO: Artigos llv 12Ago2013)

Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch- 10th anniversary apr'93

RESUMO

Os papilomavírus humanos (HPV) pertencem a uma família de pequenos vírus de DNA que infectam epitélios cutâneos e mucosos, podendo causar verrugas e até câncer em diferentes sítios anatômicos. Os HPVs são os agentes etiológicos de praticamente todos os cânceres de colo do útero, além de uma proporção significativa de cânceres de vulva, vagina, de pênis, do canal anal e da orofaringe. Estudos realizados nos últimos 40 anos contribuíram para elucidar os diversos mecanismos da oncogênese por papilomavírus e da história natural das infecções no hospedeiro natural, tendo-se definido as variáveis epidemiológicas e os riscos de desenvolvimento de neoplasia. A partir do conhecimento acumulado, novos algoritmos estão em uso para o rastreamento e prevenção dos tumores causados por HPV. Enquanto a profilaxia primária é uma intervenção promissora para a redução do impacto das doenças por HPV, são poucas as alternativas terapêuticas. O presente trabalho analisa de forma crítica, dentro de uma perspectiva histórica, os principais resultados que obtive nas últimas duas décadas, com ênfase nos seguintes aspectos da investigação que envolveu dezenas de estudantes e colaboradores no país e no mundo: (a) a transformação maligna pelas oncoproteínas E6 e E7 de HPV; b) o potencial oncogênico atribuído às diferentes variantes moleculares de HPV; c) a epidemiologia das infecções por HPV e risco de neoplasia; d) a profilaxia primária das infecções pelos HPVs mais envolvidos em doenças; e) pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Espera-se que tais avanços sejam em breve transferidos para a sociedade, seja no rastreamento eficaz da população, com a identificação precoce dos casos e aplicação de terapias efetivas e menos invasivas, seja na prevenção primária das infecções pelos tipos de HPV mais comuns, almejando a redução da carga de doença atribuída aos HPVs ou, até, sua erradicação.

ABSTRACT

Human papillomaviruses (HPV) belong to a family of small DNA virus that infect the skin and mucosa in different anatomical sites, causing different lesions including warts and cancer. HPVs are the etiological agents of practically all cervical cancers, and a significant proportion of vulvar, vaginal, penile, anal and oropharyngeal cancers. In the last 40 years the oncogenesis and natural history of infection in their natural hosts have been elucidated. From the accumulated knowledge, secondary and primary prevention of cervical cancers have been developed and implemented. On the other hand, novel therapeutic measures are not available. This work aims to review the various aspects of the scientific achievements obtained along the last two decades with the collaboration of many students and investigators and to discuss them in the context of the available literature. The main topics addressed are: a) E6 and E7-induced malignant transformation; b) differential oncogenic potential of HPV molecular variants; c) epidemiology of HPV infections and risk of cervical neoplasia with focus on prospective studies on the natural history of infection and disease in both women and men; d) primary profilaxis of HPV infection with HPV vaccines; e) search of novel diagnostic, prognostic and therapeutic markers. We hope to see this knowledge applied to the prevention and treatment of common infections which lead to a considerable disease burden.

I – INTRODUÇÃO:

UMA FAMÍLIA DE VÍRUS COM CARACTERÍSTICAS ONCOGÊNICAS DIVERSAS

Os papilomavírus humanos (HPV) pertencem à família *Papillomaviridae*, a qual é constituída por mais de 150 tipos de vírus numerados sequencialmente, que foram clonados a partir de células e tecidos, normais ou tumorais, de diferentes sítios anatômicos (BERNARD et al., 2010; IARC monograph, 2007). São compostos por um capsídeo não envelopado de aproximadamente 50nm de diâmetro, que engloba uma fita dupla e circular de DNA com cerca de oito mil pares de bases. O genoma do vírus apresenta três regiões assim denominadas: região regulatória (LCR – *long control region*), região precoce (E – *early*) e região tardia (L – *late*). A região precoce é constituída por sete ou oito genes que codificam as proteínas não estruturais envolvidas com a replicação e transcrição do DNA (genes E1 e E2) e na transformação celular (genes E5, E6 e E7). A região tardia é formada por dois genes (L1 e L2) que codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral. Os genes virais são diferencialmente expressos de maneira temporal e espacial por todo o ciclo infeccioso. As principais manifestações clínicas são as verrugas, planas ou acuminadas, que ocorrem algumas semanas após a infecção dos epitélios de diferentes localizações anatômicas.

Os HPVs infectam queratinócitos na camada basal do epitélio que fica exposta por microferidas (FIGURA 1; FRAZER, 2004). Na infecção, os genomas virais permanecem no núcleo como episômos de baixo número de cópias e os genes precoces virais são expressos. Após a divisão celular, uma célula filha migra da camada basal e sofre diferenciação celular. A replicação dos genomas virais, ocorre em células diferenciadas, caracterizando a fase produtiva do ciclo celular viral e que depende de síntese de DNA celular. Isto é assegurado pela expressão das proteínas precoces E6 e E7 que, através da interferência do ciclo celular, mantêm as células diferenciadas do epitélio em fase S, permitindo a amplificação

do genoma viral. As proteínas da fase tardia L1 e L2 encapsulam os genomas virais recém-sintetizados e os vírions são liberados das camadas mais externas do epitélio (MOODY e LAIMINS, 2010).

Nature Reviews | Immunology

Figura 1. Esquema da infecção por HPV, mostrando a expressão diferencial dos diferentes genes virais nas diferentes camadas do epitélio (FRAZER, 2004).

O potencial oncogênico dos HPVs envolve principalmente três genes precoces, E2, E6 e E7, sendo que o primeiro regula a transcrição dos outros dois. As proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco são as principais proteínas virais transformantes e a proteína E5 de HPVs de alto risco aumenta a proliferação celular, podendo contribuir com a progressão do câncer (McLAUGHLIN-DRUBIN et al., 2013; OH et al., 2010). Quando ocorre a integração do vírus no genoma humano, o gene E2 torna-se inativo, o que determina aumento da transcrição dos

genes E6 e E7. As proteínas E6 e E7 assim sintetizadas promovem a inativação de genes supressores de tumores, respectivamente os genes p53 e pRB. A consequência é a maior atividade proliferativa e mitótica celular. Além disso, estas proteínas multifuncionais atuam sobre uma série de vias celulares que interferem com o controle da proliferação e apoptose, além de eficientes mecanismos de evasão do sistema imune, o que tornam algumas destas infecções e lesões refratárias à eliminação espontânea (STANLEY, 2010). A ação combinada das proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco também resulta na abolição de muitos pontos de checagem do ciclo celular. Isto leva a um acúmulo de mutações em diversos genes celulares ao longo do tempo e consequentemente à transformação maligna das células que expressam continuamente as oncoproteínas dos HPVs de alto risco. A proteína E5 de HPV de alto risco coopera com E6 e E7 na promoção da hiperproliferação de células infectadas e isto facilita a progressão ao câncer (DIMAIO e MATTOON, 2001). Mais ainda, as proteínas precoces E2, E6, E7, E5 controlam tanto os sinais intrínsecos quanto extrínsecos da apoptose tornando a célula refratária a este importante mecanismo de eliminação viral e, em consequência, mantendo a célula transformada e promovendo a progressão tumoral (YUAN et al., 2012).

Cerca de 40 tipos de HPV são capazes de infectar as mucosas do trato aerodigestivo superior e da região anogenital dos humanos, sendo classificados em **baixo e alto risco** segundo o potencial oncogênico. O grupo de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 43 e 44) é formado por vírus associados ao aparecimento de lesões benignas, como os condilomas, a papilomatose respiratória recorrente e as neoplasias intraepiteliais de baixo grau da cérvix uterina, vulva, vagina e ânus. O grupo de alto risco é constituído por aproximadamente 15 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 73), estando implicados no

Cervical Cancer

The Nobel Committee for Physiology or Medicine 2008 Illustration: Annika Röhl

figura 2. Esquema da oncogênese por HPV no colo do útero.

aparecimento do câncer de colo do útero (100%), vulva (40 a 70%, dependendo do tipo histológico), vagina (40%), pênis (40-50%), canal anal (75-90%), boca (3%) e orofaringe (12%) (WHO, 2009). Os tipos 16 e 18, em conjunto, são responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer do colo do útero (WHO, 2009) e os tipos 6 e 11 pela maioria dos condilomas acuminados (STANLEY, 2012) e a totalidade dos casos de papilomatose respiratória recorrente (DERKAY, 2008). Contudo, até mesmo os vírus considerados de baixo risco podem ser encontrados em tumores malignos, porém em menor frequência. Os HPVs 6 e 11, por exemplo, estão entre os dez HPV mais prevalentes no câncer de vagina (9,3% dos casos), vulva (2%), pênis (5%) e canal anal (0,7%). Entretanto, ainda não está claro seu envolvimento causal nestes tumores.

A classificação epidemiológica dos HPVs por risco de doença, está correlacionada com a capacidade diferencial que os tipos de HPV exibem em

transformar células epiteliais. Isto foi examinado através de diferentes abordagens experimentais, desde a demonstração da capacidade diferencial da proteína E6 de diversos HPVs de degradar p53 *in vitro* (IFTNER et al., 2006), a ensaios quantitativos de transformação de queratinócitos humanos (VILLA E SCHLEGEL, 1991; ANEXO). Demonstramos que HPV 18 transformava estas células primárias mais eficientemente que HPV 16, mapeando esta atividade no fragmento genômico que inclui a região regulatória (LCR) e os genes E6 e E7. Estes dados corroboraram as observações de que os adenocarcinomas tem um curso e prognóstico pior que os carcinomas escamosos da cérvix-uterina, sendo o HPV 18 mais prevalente nos primeiros (IARC Monograph, 2007).

Em sequência, nos perguntamos como seria o efeito de um potente inibidor de proliferação de queratinócitos – o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) – em células imortalizadas por HPV 16 ou HPV 18. Observamos que os queratinócitos imortalizados por HPV 16 eram mais sensíveis ao TNF-alfa do que seus equivalentes com HPV 18 (VILLA et al., 1992; ANEXO). Aprofundamos estes achados com a caracterização das proteínas regulatórias do ciclo celular como ciclinas A, B e p34^{cdc3}, tendo observado diferenças compatíveis com a diminuição de proliferação nas células contendo HPV 16 quando comparadas às resistentes (HPV-18) (VIEIRA et al., 1996; ANEXO). O próximo passo consistiu em melhor caracterizar estas respostas atribuindo à proteína E7 o efeito de resistência ao efeito citostático do TNF-alfa.

Contávamos na época com um sistema de última geração de análise de expressão diferencial de genes por microarranjos de DNA e a demonstrada expertise de diversos colaboradores do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Empreendemos então diversos experimentos que resultaram na identificação de genes diferencialmente expressos, segundo o tratamento da célula e o tipo de HPV transfectado. Como antecipado, vários desses genes estão envolvidos na regulação do ciclo celular (BOCCARDO et al., 2010, ANEXO;

TERMINI et al., 2008) e são agora objeto de estudos mais aprofundados, conforme discutido adiante.

A oncogênese por HPV envolve a participação de duas proteínas virais precoces E6 e E7 e sua interação com múltiplas proteínas celulares (McLAUGHLIN-DRUBIN E MUNGER, 2013). Dentre inúmeras, demonstramos a indução da expressão e atividade da metaloproteinase 9 (MMP-9) pela proteína E7 de HPV 16, em queratinócitos primários e culturas organotípicas (CARDEAL et al., 2012; ANEXO). Mais ainda, observa-se uma diminuição da expressão de RECK e TIMP-2, inibidores de MMP-9, indicando que a ação de E7 poderia ser dependente das alterações destas proteínas capazes de interferir com proteínas da matrix extracelular, potencialmente facilitando a invasão tumoral, formação de metástases e recorrência do tumor. Estas hipóteses estão sendo testadas em séries de tumores do colo do útero visando corroborar nossos achados em células e culturas organotípicas de queratinócitos humanos.

No complexo cenário de interações entre o vírus e seu hospedeiro também exploramos diversos aspectos das vias envolvidas na transformação celular e nos diferentes níveis de interferência do microambiente tumoral, incluindo moléculas e células responsáveis pelas respostas imunes. O objetivo principal deste projeto temático é o de explorar as interações entre as células que expressam oncogenes de HPV E6 e E7 e os demais elementos celulares e acelulares que compõem e regulam o microambiente tumoral (FIGURA 3). Incluímos nestes estudos proteínas da matriz extracelular e diferentes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, secretados pelos vários tipos celulares presentes, visando o entendimento dos processos patológicos associados à carcinogênese por HPV. Há vários aspectos do microambiente celular que podem ser modificados por células expressando as oncoproteínas de HPV de alto risco. Dentre eles, a alteração das células que infiltram o ambiente tumoral podendo atuar de forma a promover ou inibir o crescimento do tumor.

Nossos resultados, até o momento, confirmam que células tumorais que expressam oncoproteínas de HPV são capazes de alterar o perfil de diferenciação de células mononucleares de sangue periférico *in vitro*. *In vivo*, experimentos realizados em camundongos imunocompetentes com tumores associados ao HPV revelam aumento de proliferação em populações de macrófagos e células CD11bGr1; enquanto isso, linfócitos B de camundongos nude também apresentam maior taxa de proliferação quando provenientes de animais com tumores associados ao HPV. Além disso, células derivadas de câncer do colo do útero positivas para HPV (HeLa e SiHa) quando injetadas em camundongos nude recrutam um número significativamente maior de células inflamatórias que tumores causados por C33 (linhagem derivada de câncer do colo do útero sem DNA de HPV ou expressão das oncoproteínas virais. Ainda incipientes, mas muito relevantes, os estudos com infiltrados inflamatórios de tumores de colo do útero removidos de pacientes indicaram a presença de diversas células do sistema imune, onde algumas vias de sinalização parecem diferencialmente ativadas. Estes resultados potencialmente importantes estão sendo confirmados para publicação em breve.

Nossas observações e de outros grupos de pesquisa indicam que o perfil de expressão de citocinas é diferente entre células em cultura e células isoladas a partir de tumores, o que indica que o ambiente tumoral não condiciona apenas as células do hospedeiro, mas também as células tumorais. O conjunto dos resultados, incluindo a caracterização dos diferentes infiltrados e testes funcionais, deverão estar disponíveis em breve.

Além dos aspectos relativos às alterações do microambiente tumoral, como descrito acima, a tumorigênese mediada por HPV depende da regulação e execução de vias da morte celular programada e vias envolvidas nas respostas ao estresse celular. Nossos resultados preliminares sugerem a interferência das oncoproteínas de HPV na expressão de proteínas reguladoras da apoptose como

citocromo C e o receptor de TRAIL, o que poderia explicar a resistência à indução de apoptose em resposta a esta citocina observada em células que expressam genes de HPV. Assim, é fundamental continuar buscando que proteínas estão envolvidas nestas vias metabólicas, além de investigar o estado da via de TRAIL nas linhagens derivadas de tumores HPV-positivos, visando identificar as bases moleculares das diferenças observadas. Nesta análise devem ser incluídas amostras de queratinócitos que

Figura 3. As diferentes interfaces de interação e potencial interferência das oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco, tanto na célula que infecta, quanto nas células que compõe o microambiente tumoral como macrófagos.

expressam as proteínas E6 e E7 de HPV tanto de alto quanto de baixo risco oncogênico. Além disso, serão realizadas as análises correspondentes ao estudo do efeito das proteínas virais, TNF e TRAIL sobre receptores solúveis não-hematopoiéticos e proteínas relacionadas. Além das vias descritas acima, há evidências da participação de receptores de membrana envolvidos em resposta imune inata na carcinogênese a HPV é objeto de outro sub projeto com potencial implicação no microambiente de tumores causados por HPV. Resultados anteriores do grupo, ainda não publicados, indicaram a interferência de E6 e E7 de HPVs de alto risco oncogênico nas vias de sinalização de Receptores tipo Toll (TLRs). Atualmente estamos empenhados em identificar que genes e proteínas da via de sinalização de TLRs estariam envolvidas na promoção da transformação por HPV, assim como mapear o sítio de interação entre as oncoproteínas e os componentes das vias de TLRs.

Em linha com nosso principal objetivo de analisar o microambiente tumoral em células que expressam os oncogenes de HPV, estamos analisando os efeitos da hipóxia em células tumorais. Fatores que contribuem para esse deslocamento no metabolismo glicolítico são c-Myc e HIF1- alfa. Interessantemente, lactato pode ser transportado da célula tumoral para os macrófagos infiltrantes do tumor para estabilizar HIF1 α , alfa, induzir a expressão de c-Myc e promover alterações que promovem fenótipo supressor da resposta imune e pró-angiogênico. Nossos dados mostram que os transportadores de monocarboxilatos (MCT), como é o caso do lactato, aumentam conforme aumenta o grau das lesões do colo uterino associadas ao HPV. Estes dados, ainda não publicados, serão corroborados por análises adicionais tanto em modelos animais quanto em tecidos de neoplasias de colo do útero.

II - VARIABILIDADE GENÉTICA E RISCO DE DOENÇA

O genoma dos HPVs é composto por genes responsáveis pelo controle da transcrição e replicação do DNA (E1, E2), e na transformação celular (E5, E6 e E7); pelos genes tardios L1 e L2, da região tardia, que transcrevem a proteína principal e secundária do capsídeo, respectivamente (VILLA, 1997). A região não codificante entre os genes L1 e E6 é denominada de LCR (*Long Control Region*) e compreende aproximadamente 10% do genoma viral. Fatores de transcrição virais e celulares se ligam a sequências específicas da LCR regulando a transcrição dos genes precoces (BERNARD, 2002).

A taxa de variabilidade nucleotídica na LCR e nos diversos genes virais difere entre os vários tipos de HPV. Variações no genoma no gene tardio L1 maiores que 10% definem novos tipos de HPV, enquanto que variações menores que 2% caracterizam **variantes** de um tipo (BERNARD, 2005).

A análise da variabilidade nucleotídica intra-típica de HPV-16 tem sido extensivamente estudada e serve como ferramenta importante para traçar a filogenia e evolução destes vírus, além de ser utilizada em estudos sobre a história natural das infecções por HPV. No início dos anos 90, juntamente com vários colaboradores, publicamos a variabilidade nucleotídica de um fragmento da LCR de 300 amostras HPV-16 positivas oriundas de 25 países em distintas regiões geográficas (HO *et al.*, 1993; ANEXO). A árvore filogenética gerada é composta por 5 ramos, e o nome destes ramos reflete a origem da maior parte dos isolados que os compõe: ramos africano 1 e 2 (Af-1 e Af2), asiático-americano (AA), asiático (As) e europeu (E). Estudos semelhantes foram feitos com espécimes biológicos contendo HPV 18, provenientes de 4 continentes, compondo uma árvore filogenética com origem na África e ramos correspondentes aos principais grupos étnicos (ONG *et al.*, 1993; ANEXO). A dispersão e a baixa taxa de evolução de HPV-16 sugerem que estes co-evoluíram com os seus hospedeiros naturais em um período de alguns milhões de anos.

Desta maneira, a colonização das Américas por europeus e africanos é refletida na composição das variantes de HPV neste continente (HO *et al.*, 1993).

Ho *et al.*, 1993

Ong *et al.*, 1993

Figura 4. Árvores filogenéticas contruídas com variantes de HPV 16 (esquerda) e HPV-18 isolados de pacientes de diferentes regiões

Nesta mesma época, estávamos desenhando nosso primeiro estudo de coorte de história natural das infecções por HPV, sendo nossa principal hipótese a de que apenas as infecções persistentes por HPV determinariam risco para desenvolvimento de neoplasia cervical. Sugerimos, então, utilizar a variabilidade genética de um fragmento da LCR de HPV 16 e 18 para distinguir a infecção persistente da reaquisição da infecção, das amostras do estudo Ludwig-McGill (vide adiante) por diferentes variantes moleculares do mesmo tipo de HPV (Franco *et al.*, 1999. ANEXO; Villa *et al.*, 2000; ANEXO). Observamos que a mesma variante estava sempre presente em nas diferentes amostras colhidas ao longo do tempo da mesma voluntária, reforçando o conceito de real persistência viral. De modo importante, este estudo revelou que as **variantes não-européias** de ambos tipos virais estão mais associadas à persistência da infecção, além de maior risco de desenvolver lesões de alto grau prevalentes e incidentes (SICHERO

et al., 2007; ANEXO VILLA *et al.*, 2000; ANEXO) (TABELA). Seguiram-se diversas publicações com resultados semelhantes em estudos conduzidos nos Estados Unidos, Costa Rica e México, mas não na Europa (revisado por SICHERO E VILLA, 2006). Concluiu-se que a associação entre variantes de HPV e risco de doença do colo do útero deve ser afetada não apenas pela prevalência de cada variante nas diferentes populações, mas também por diferenças funcionais intrínsecas de cada variante. Já se sabia que HPV-18 é aproximadamente 10 vezes mais potente em imortalizar queratinócitos do que HPV-16 e que essa diferença fora mapeada na região viral da LCR-E6-E7 (VILLA E SCHLEGEL, 1991; ANEXO). Daí a buscar o significado funcional das variações nucleotídicas na LCR em diferentes variantes de HPV foi consequência natural.

Diferenças na atividade transcricional entre variantes Europeias e Asiático-Americanas de HPV-16 foram descritas em diversas publicações (IARC Monograph, 2007). Adicionalmente, uma análise extensiva da proteína E6 de diferentes variantes moleculares de HPV-16 identificou substituições de aminoácidos em posições cruciais para a interação com TP53 ou em posições que fazem parte de epítomos imunogênicos. além de diferenças no potencial transformante. Estudos do nosso laboratório indicaram que queratinócitos humanos transduzidos com E6/E7 das variantes AA e E-350G superaram aqueles infectados com a variante E em ensaios de proliferação celular e na habilidade de crescimento independente de ancoragem (SICHERO *et al.*, 2012; ANEXO). Ainda mais foi analisado o perfil de expressão gênica de queratinócitos recém-infectados (p5) e daqueles potencialmente imortalizados (p30). Entre outros, observou-se a expressão aumentada do transcrito de *MAP2K1* especificamente em queratinócitos infectados com a variante E-350G (ou L83V). Estes dados reforçam dados de outros que observaram que a via de MAPK está aumentada em células expressando a proteína E6 da variante E-350G (ou L83V) e que a variante 350G superou a variante E6 protótipo na cooperação da transformação com NOTCH1 ativado (CHAKRABARTI *et al.*, 2004).

Em conjunto, assim como alguns tipos de HPV são mais oncogênicos, as variantes asiático-americanas de HPV 16 são epidemiológica e funcionalmente mais associadas a tumor que as outras variantes, sugerindo-se que poderiam servir como fatores prognósticos na progressão das lesões precursoras do câncer de colo do útero. Também faltam estudos sobre variantes de outros tipos que não HPV 16 e 18, e da diversidade de genomas de HPV em amostras de tumores em outros sítios. Pela sua relevância em saúde, analisaremos séries de tumores de cabeça e pescoço; adicionalmente verificaremos a associação de certos tipos de HPV e variantes com tipos histológicos específicos. Em conjunto, tais resultados poderão contribuir para a definição de medidas preventivas das infecções por HPV na cavidade oral e orofaringe, incluindo a avaliação do impacto das vacinas profiláticas de HPV em tumores de diferentes sítios anatômicos.

TABLE IV – AGE AND RACE-ADJUSTED HAZARD RATIOS¹ (AND 95% CONFIDENCE INTERVALS) FOR THE ASSOCIATION BETWEEN HPV INFECTION STATUS AT ENROLLMENT AND INCIDENCE OF HIGH-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS FOR DIFFERENT FOLLOW-UP PERIODS

HPV categories	Follow-up period	Number of HSILs	Women-months	HR	95% CI
Negative	0–2 years	7	40,646.75	1.00	Referent
LR only		2	3,544.70	3.20	0.7–15.5
Other HR		4	3,576.42	5.99	1.7–20.8
HPV-16					
European		1	747.62	7.35	0.9–60.5
Asian–American	0–5 years	1	162.15	29.03	3.4–249.8
African		1	89.54	57.89	6.5–512.1
Asian		0		ND	
Negative		13	95,469.60	1.00	Referent
LR only		3	8,165.83	2.52	0.7–8.9
Other HR	Entire follow-up	7	8,093.61	5.62	2.2–14.2
HPV-16					
European		1	1,684.44	4.20	0.5–32.4
Asian–American		1	373.61	13.26	1.7–104.7
African		1	206.19	42.96	5.2–352.9
Asian	Entire follow-up	0		ND	
Negative		15	119,570.53	1.00	Referent
LR only		3	10,029.34	2.20	0.6–7.6
Other HR		8	9,502.85	5.84	2.5–13.9
HPV-16					
European		1	2,042.42	3.45	0.5–26.3
Asian–American		1	489.74	12.64	1.6–97.9
African		1	266.42	31.04	3.9–249.8
Asian		0	–	ND	

¹Hazard ratios and 95% CI estimated by Cox proportional hazard regression adjusted for age and race. Estimates excluded prevalent cases at baseline.

III - HISTÓRIA NATURAL DAS INFECÇÕES POR HPV

Estudos caso-controle contribuíram para o esclarecimento da associação epidemiológica entre a infecção por HPV e o câncer de colo do útero (BOSCH et al., 1995; FRANCO et al., 2003). Mulheres com infecção por HPV de alto risco oncogênico, têm risco relativo em média 100 vezes maior de desenvolver esta neoplasia, quando comparadas às mulheres não portadoras deste tipo de infecção. Estes estudos foram fundamentais para estabelecer o vínculo etiológico entre HPV e câncer de colo do útero, mas a dinâmica da infecção e o risco de desenvolver lesão só se esclareceu com estudos prospectivos complexos, envolvendo milhares de indivíduos, com seguimentos prolongados e utilizando diferentes instrumentos de medidas tanto de laboratório quanto de análise epidemiológica. Foi assim que nos envolvemos em um dos mais importantes estudos de história natural das infecções por HPV e neoplasia cervical, a coorte Ludwig-McGill, em alusão às filiações de seus investigadores principais Luisa Villa e Eduardo Franco, respectivamente (FRANCO et al., 1999a; ANEXO).

Iniciado em 1993, incluiu duas mil e quinhentas mulheres da cidade de São Paulo, que foram seguidas por até 10 anos. Com a participação de dezenas de estudantes e colaboradores, aqui e em Montreal, foram geradas inúmeras publicações e teses, aportando resultados significativos para a área. Através desta coorte pudemos contribuir para descrever os fatores virais (tipo e variante de HPV, carga viral, integração), do hospedeiro (polimorfismo de HLA I e II; de TLR9), relacionados à infecção, ao risco de desenvolvimento de doença, além de hábitos e exposições (sexuais, reprodutivos, tabaco, contraceptivos), o que nos colocou no cenário dos principais estudos realizados na América Latina (FIGURA 5). Vários são os resultados derivados deste amplo estudo de coorte, sendo um dos primeiros a propor que as infecções por HPV são causa necessária ao desenvolvimento do câncer de colo do útero (FRANCO et al., 1999b; ANEXO).

Figura 5.

Principais estudos de HPV (coorte e séries de cânceres de colo do útero) na América Latina e no Caribe

Certamente um dos principais resultados da coorte Ludwig-McGill foi o de determinar que a persistência da infecção por HPV é a principal causa para o desenvolvimento do carcinoma de colo uterino, principalmente para os tipos 16 e 18 (SCHLECHT et al., 2001. ANEXO). A duração mediana de infecções por HPV de alto risco oncogênico é de aproximadamente 7-9 meses (FRANCO et al., 1999b; GIULIANO et al., 2002), sendo mais duradouras que as infecções por tipos não oncogênicos. Investigamos, ainda, o papel da carga viral (número de cópias de DNA de HPV) na persistência das infecções e concluímos que esta medida pode prever o risco de neoplasia intraepitelial cervical (SCHLECHT et al., 2003a; ANEXO). Assim, a medida de carga viral poderia ser utilizada para identificar mulheres sob risco de desenvolver tumores cervicais. Outros estudos corroboram este achado, mas até o momento ainda não se demonstrou o uso prognóstico desta medida. Por outro lado, a detecção de HPVs de alto risco,

particularmente dos tipos 16 e 18, é capaz de identificar lesões com mais propensão à progressão, ou que progredirão de forma mais rápida (SCHLECHT et al., 2003b; ANEXO). Estes resultados e aqueles derivados de outros estudos de coorte definiram o valor prognóstico da tipagem de HPV, destacando os HPVs 16, 18 como aqueles com o maior potencial oncogênico. O resultado negativo, ou a detecção de outros tipos de HPV diferentes de 16 e 18, identifica indivíduos com baixo risco de desenvolver neoplasia, que poderão ser seguidos em intervalos mais espaçados, com redução de custos e de procedimentos desnecessários. Outro resultado muito relevante deste estudo prospectivo é que as taxas de infecção e reinfecção em mulheres seguidas no tempo são influenciadas pela atividade sexual: o relato de novos parceiros sexuais está associado à nova detecção de HPV mesmo em mulheres mais velhas ou naquelas com evidência sorológica de prévia exposição ao HPV (TROTIER et al., 2010). Esta é uma indicação de que as respostas imunes naturais não parecem proteger das reinfecções por diferentes tipos de HPV. Continuamos analisando e publicando resultados deste bem-conduzido e produtivo estudo epidemiológico das infecções por HPV e risco de neoplasia cervical.

O sucesso do estudo Ludwig-McGill nos levou a realizar um protocolo muito semelhante em homens, com início em 2003, sendo conhecido como estudo HIM (HPV IN MEN). Com o objetivo de definir as infecções e risco de doença na região genital, anal e oral de homens de 18 a 70 anos, residentes nos Estados Unidos da América (Tampa, FL), no México (Cuernavaca) e no Brasil (São Paulo). Quatro mil e quinhentos homens, seguidos por pelo menos 4 anos serão investigados quanto à prevalência de tipos específicos virais nos 3 sítios anatômicos, os correlatos epidemiológicos das infecções por HPV, a duração das infecções e respostas sorológicas à exposição ao HPV (GIULIANO et al., 2008).

A região genital masculina exibe uma prevalência elevada de HPVs (em torno de 65%), enquanto no canal anal é de 8% em heterossexuais e 24% em homossexuais. A menor frequência é observada na cavidade oral (em torno de

4%). A incidência de infecção genital foi elevada, com um tempo médio de eliminação de 7 meses para os tipos de baixo risco e de 12 meses para os de alto risco, estando associado ao elevado número de parceiras sexuais (GIULIANO et al., 2011). Esta coorte vem acumulando muitos resultados ao longo dos anos, dentre os mais recentes a descrição de um número elevado de Beta e Gama papilomavírus, além dos Alfapapilomavírus (HPVs mucosos, ou tipos 6, 11, 16, 18, etc). Estudos da diversidade de HPVs na região peniana e anal e sua correlação com persistência viral e desenvolvimento de lesões tem o potencial de contribuir para a prevenção das infecções e doenças por HPV em homens.

IV - IMPACTO DAS DOENÇAS POR HPV E SUA PREVENÇÃO

De maneira global, estima-se que 5,2% de todos os cânceres em homens e mulheres sejam atribuídos ao HPV e isto, juntamente com as lesões intraepiteliais de todos os graus e as verrugas, constituem uma doença de importância mundial (STANLEY, 2012). Em mulheres vivendo em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a taxa de tumores causados por HPV pode representar até 10% de todos os cânceres. Dentre os diversos tumores causados por HPV destaca-se o câncer de colo do útero, com uma estimativa mundial de meio milhão de casos novos por ano (WHO, 2009). A incidência é variável por região geográfica, sendo mais frequente em países menos desenvolvidos, aonde corresponde à segunda causa de câncer em mulheres, perdendo apenas para o câncer de mama. Ainda mais grave é a elevada mortalidade associada a esta neoplasia, registrando-se anualmente no mundo cerca de 250.000 mortes em decorrência da doença. Aproximadamente 80% dos casos ocorrem nos países em desenvolvimento, com coeficientes de incidência maiores na América Latina, Caribe, África sub-saariana e sul e sudeste da Ásia. A América Latina apresenta uma das mais altas taxas de incidência de câncer cérvico-uterino do mundo, sendo a incidência anual ajustada por idade de 44,4/100.000, muito superior a da América do Norte (9,5/100.000) (CURADO *et al.*, 2007). Esta neoplasia é um dos mais importantes problemas de saúde em países em desenvolvimento como o México e o Brasil (VILLA, 2012). Segundo a última edição do *Cancer incidence in five continents* publicada (14), as incidências mais elevadas no mundo foram registradas em Harare, em Zimbábue (África), com coeficiente padronizado de 47,3 (por 100.000 mulheres), e Trujillo, no Peru, com 43,9. A seguir, as maiores incidências foram registradas no Brasil, respectivamente em Cuiabá (37,7), Brasília (37,7) e Goiânia (33,9). São Paulo ocupou a 13ª posição, com coeficiente padronizado de 21,1. A taxa de mortalidade ajustada por idade é de 4,9 óbitos/100.000 mulheres, variando de 3,3/100.000 mulheres/ano (São Paulo e Santa Catarina) a 15,0/100.000 mulheres/ano (Amazonas) (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que haja no mundo cerca de 440 milhões de indivíduos com a infecção genital pelo HPV e que aproximadamente 10% de todas as mulheres estão infectadas por algum tipo de HPV (de SANJOSÉ et al., 2007). Estudos realizados em diversos países dos cinco continentes revelam diferentes frequências de DNA de HPV, sendo mais elevadas em países africanos e menos elevadas em alguns países europeus. Na América Latina, temos registros de taxas moderadas de HPV: no Brasil, por exemplo, há diversos relatos de estudos envolvendo mulheres de quase todas as regiões do país, sendo as taxas de prevalência de HPV, de um modo geral, semelhantes às aquelas publicadas em outros países, ou seja, em torno de 15% da população em geral. Estas taxas determinam que as infecções por HPV, clínicas e subclínicas, estejam entre as infecções sexualmente transmitidas mais comuns em todo o mundo. Os tipos mais prevalentes no País também não divergem sobremaneira daqueles reportados em outras partes do mundo, como demonstrado por diversos projetos por nós conduzidos nos anos 80 e 90, envolvendo esfregaços de colo de útero e fragmentos de tumores de diferentes localizações anatômicas. HPV 16 é o tipo mais freqüente tanto nas lesões precursoras quanto no carcinoma invasivo de colo do útero, seguido dos tipos 18, 31, 45, com algumas variações por região geográfica (WHO ICO, 2009). Cerca de 69% dos cânceres cervicais invasivos no Brasil são atribuídos ao HPV 16 ou 18 (http://www.who.int/hpvcentre/Estatísticas/dinâmico_ico/country_pdf/BRA.pdf). Uma publicação recente indica uma proporção ainda maior de HPV 16 em uma série ampla de cânceres de colo do útero (deOLIVEIRA et al., 2013), evidenciando o elevado potencial oncogênico deste tipo de HPV que também é o mais prevalente em cânceres do canal anal, de vulva, de vagina, de pênis e da orofaringe.

O Programa Nacional de Controle do Cancer do Colo do Útero no Brasil baseia-se na detecção precoce deste câncer em mulheres assintomáticas, com o objetivo de reduzir sua incidência e mortalidade. O rastreamento populacional é

recomendado prioritariamente para as mulheres de 25 a 60 anos, através do exame Papanicolaou, com periodicidade de tres anos, após dois exames consecutivos normais, no intervalo de um ano (Diretrizes MS INCA, 2011). Para a estruturação do rastreamento organizado de base populacional, as ferramentas de informação, o modelo de financiamento e as práticas de convocação e registro de mulheres atualmente disponíveis são insuficientes; consequentemente o modelo oportunístico predomina no país, apesar de apresentar menor custo-efetividade. Apesar dos esforços do governo para melhorar as taxas de cobertura do exame de Papanicolaou, as taxas de incidência e mortalidade pela doença permanecem elevadas e o diagnóstico continua tardio. O reconhecimento do HPV como causa central do câncer do colo uterino criou novas abordagens na prevenção desta doença, incluindo a prevenção e controle da infecção genital pelo HPV, através da vacinação e estratégias de promoção da saúde.

Identifying Cancer Cells, American Society of Clinical Pathologists

O teste de citopatologia cervical denominado “Papanicolaou” teve um papel importantíssimo no decréscimo da incidência do câncer de colo uterino, notadamente nos países desenvolvidos. O Papanicolaou convencional, contudo, apresenta diversas dificuldades quanto à coleta, preparo das lâminas e leitura.

Avanços nos métodos moleculares e no conhecimento da história natural da doença culminaram em novas tecnologias para o rastreio, cujo alvo é o material genético do HPV. São técnicas automatizadas, compatíveis com grandes rotinas como é o caso do rastreio populacional. Sua maior sensibilidade é conhecida em vários estudos em diferentes países e realidades. Um algoritmo mais racional derivado desses estudos sugere o emprego do teste molecular no rastreio primário, e a citologia, por sua maior especificidade, restrita às amostras HPV-DNA positivas, em que esses HPVs são do grupo denominado de alto risco para câncer. Nesse sentido, a citologia de base líquida oferece um único meio de coleta, que preserva os ácidos nucleicos, permite o transporte e armazenamento das amostras à temperatura ambiente.

O INCT-HPV realizou em 2009-2011 um estudo de avaliação das técnicas moleculares, mostrando altíssimo valor preditivo negativo (> 99%) e elevada sensibilidade. Finalmente, visando ampliar nossa linha de atuação em **prevenção de câncer**, participaremos de um estudo coordenado pela Fundação Oncocentro de São Paulo (FOSP) (Prof José Eluf Neto) intitulado: **Citologia líquida e teste molecular para HPV: avaliação de novas modalidades de rastreio para prevenção de câncer de colo uterino na Rede Pública de Saúde do Estado de São Paulo**. Mulheres com resultado citológico alterado ou positivas para HPV de alto risco serão encaminhadas para a colposcopia e eventual biópsia a critério médico, permitindo assim avaliar a taxa de falso-negativos da citologia, e projetar as consequências de um rastreio primário apenas com teste molecular. O estudo permitirá avaliar os obstáculos encontrados na eventual implantação de um novo algoritmo de rastreio para o câncer cervical baseado em teste molecular de HPV e citologia reservada àquelas amostras positivas.

Prevenção primária das infecções e doenças por HPV

A vacina para o HPV como estratégia de prevenção primária para o controle do câncer de colo do útero baseia-se no princípio da indução de respostas imunes potentes e específicas contra os principais tipos de HPVs causadores de tumor. As duas versões da vacina atualmente disponíveis foram desenvolvidas com técnica recombinante e não contém o vírus vivo ou atenuado ou material genético. Elas são compostas pelo chamado VLP (*virus-like particle*), uma partícula que se assemelha estruturalmente ao capsídeo do vírus. Uma delas protege contra os vírus 6, 11, 16 e 18, sendo conhecida por vacina quadrivalente (Gardasil®, Merck & Co) e a outra (bivalente) confere imunidade para os vírus 16 e 18 (Cervarix®, GlaxoSmithKline).

Ambas as vacinas são eficazes contra a infecção pelo HPV nas mulheres que no momento da vacinação não tinham evidência de exposição prévia ou infecção vigente pelo vírus (HILDESHEIM et al., 2009). A eficácia da vacina é próxima de 100% para a prevenção de lesões intraepiteliais cervicais, e no caso da vacina quadrivalente, para condilomas e lesões intraepiteliais vulvares e vaginais (VILLA et al., 2005; ANEXO). A eficácia é menor quando as mulheres têm

infecção prévia ou vigente pelo HPV no momento da vacinação. As vacinas não são eficazes para o tratamento de lesões HPV-induzidas, devendo utilizá-las somente com intuito profilático. A vacina quadrivalente foi aprovada para administração em homens para prevenção de verrugas genitais e também para prevenção das infecções e lesões anais em homens e mulheres.

A proteção conferida pelas vacinas profiláticas de VLPs de HPV resulta da formação de anticorpos neutralizantes contra os tipos de HPV contidos nas mesmas. Embora a infecção natural pelo HPV induza resposta humoral somente em metade dos casos, a vacina é capaz de induzir a formação de anticorpos em praticamente todos os indivíduos vacinados e em títulos muito mais elevados que na exposição natural. Contudo, não são conhecidos os títulos mínimos de anticorpos que são capazes de manter eficácia preventiva. Estima-se que estas vacinas de VLPs possam exibir imunidade profilática prolongada por disparar memória imunológica, conforme demonstrado (OLSSON et al., ; VILLA et al., 2006; ANEXO). Ambas são bem toleradas, a despeito de produzirem efeitos no local da injeção, como edema, eritema e dor em intensidade variável. Nos ensaios clínicos, a proporção de efeitos adversos se manteve semelhante entre as mulheres vacinadas e o grupo controle.

Baseado nos resultados dos ensaios clínicos realizados, ambas as vacinas foram aprovadas em centenas de países do mundo, inclusive no Brasil que, recentemente (julho de 2013) aprovou sua implementação no Programa nacional de Imunização para meninas (10 e 11 anos), a partir de 2014.

Apesar das vacinas conferirem imunidade contra os tipos de HPV relacionados a 70% dos cânceres de colo do útero, ainda persiste a possibilidade de infecção por outros tipos de HPV de alto risco menos prevalentes. Desta forma, ainda se faz necessária a prevenção secundária do câncer do colo do útero através de citologia cervical. Vacinas de segunda geração incluem 5 tipos adicionais de HPV de alto risco, o que aumentará a cobertura para 90% dos casos.

É plausível antecipar que ao se reduzir a incidência das lesões precursoras cervicais, o número de casos novos de câncer de colo do útero também sofrerá redução apreciável ao longo dos anos. Um forte indicador de que de fato isto poderá ocorrer foi a demonstração da redução de mais de 90% no risco de novos casos de verrugas genitais em jovens mulheres australianas às quais a vacina quadrivalente vem sendo oferecida desde 2007, num programa de imunização nacional (READ et al., 2011).

A implantação de um programa nacional de vacinação contra o HPV no Brasil será um grande desafio aos gestores. Além das questões financeiras, há dúvidas acerca de outros pontos, como a faixa etária ideal para a vacinação, a melhor forma de adesão ao programa e a duração da imunização oferecida pela vacina, além do receio de que a vacina possa interferir no programa de rastreamento do câncer de colo do útero. Ao que parece, a vacinação no ambiente escolar teria melhor adesão e aceitação entre os pais e as meninas, como demonstrado em outros países. Um estudo demonstrativo recentemente publicado indica que houve elevada aceitação da vacina, com taxas de cobertura acima de 85%, quando aplicada em escolas públicas e privadas da cidade de Barretos (FREGNANI et al., 2013; ANEXO), após orientação dos pais, alunos e professores. Entretanto, ainda há muitos detalhes envolvidos na implementação deste programa de vacinação que, esperamos, seja iniciado em 2014.

V - A BUSCA DE NOVAS MODALIDADES TERAPÊUTICAS

Apesar da existência de vacinas profiláticas eficazes contra os tipos mais prevalentes de HPV, o maior benefício ocorrerá em meninas e mulheres jovens que não tenham iniciado atividade sexual. Desta forma, para uma grande parcela da população feminina que já desenvolveu ou ainda vai desenvolver lesões no colo uterino, é necessário desenvolver abordagens diagnósticas, prognósticas e terapêuticas mais eficazes. Em adição, sabe-se que há pacientes com as mesmas características clínico-patológicas que exibem respostas diferentes à terapia selecionada. Estes diferentes padrões de resposta estão diretamente relacionados ao caráter heterogêneo dos tumores levando em consideração suas características genéticas e epigenéticas. A partir do sequenciamento completo do genoma humano e da disponibilidade de tecnologia de análise de genoma em alta escala, tornou-se possível obter o catálogo completo das mutações somáticas de um tumor individual, incluindo todas as mutações pontuais, rearranjos e alterações no número de cópias (Campbell *et al.*, 2008; Stratton *et al.*, 2009). Aliado ao desenvolvimento de conhecimento e ferramentas de análise na área da Bioinformática, encontram-se hoje descritos os exomas (genomas completos) de diversos tipos de cânceres, com resultados muito interessantes. Ainda muito importante para a compreensão do câncer é a identificação de alterações epigenéticas (padrão de metilação do DNA, modificação de histonas, remodelagem de cromatina) e expressão diferencial de genes (Tran *et al.*, 2012). O estudo do transcriptoma pode ser uma abordagem metodológica eficiente na busca de potenciais marcadores moleculares para algumas doenças, incluindo o câncer de colo do útero (Witten *et al.*, 2010). No caso desta neoplasia, a resposta ao tratamento pode ainda variar dependendo do tipo de HPV presente no tumor. De fato, uma das linhas de pesquisa de nosso grupo se concentra na identificação de marcadores moleculares baseada na expressão diferencial de genes em queratinócitos normais e infectados por HPV-16 e HPV-18, analisados em diferentes condições (Termini *et al.*, 2008, 2010, 2011; Boccardo 2010). Apesar

dos resultados relacionando ncRNAs e miRNAs alterados em câncer de colo do útero (Agarwal *et al.*, 2010), nenhum genoma completo de câncer de colo de útero foi publicado até o momento. Consideramos, portanto, ser importante constituir uma rede de colaboradores para a realização do sequenciamento dos dois tipos mais frequentes deste tumor – os escamosos e os glandulares - e o estudo detalhado do genoma e do transcriptoma dos dois subtipos de tumor cervical mais prevalentes na população brasileira: carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. Este esforço será empreendido por grupos do Instituto Nacional do Câncer (INCA, Rio de Janeiro) e pelo Centro de Bioinformática (CeBio, Belo Horizonte), visando, juntamente com os especialistas em HPV, obter informações que contribuam à novas descobertas na área.

Em estudos anteriores do grupo foram identificados diversos genes diferencialmente expressos quando comparados queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 e 18, através da técnica de *Microarray*. Análise aprofundada dos dados possibilitou a identificação de dois marcadores associados às lesões mais graves do colo uterino: hK7 (calicreína-7) e SOD2 (superóxido dismutase-2) (TERMINI *et al.*, 2010 e 2011; ANEXO).

O estabelecimento do padrão de alteração de algumas proteínas, tanto em biópsias, como em amostras derivadas de esfregaços e em soro, tem como principal objetivo definir marcadores com alto poder preditivo para identificar e avaliar estes tipos de neoplasias associadas ao HPV. A utilização destes marcadores poderá complementar o resultado de outros exames rotineiramente realizados na cérvix uterina, por exemplo, como o exame de Papanicolau e a pesquisa para presença de HPV, na triagem de lesões precursoras de baixo e alto grau, com maior risco de progressão. Este tipo de abordagem poderá contribuir na estratégia a ser utilizada no tratamento destas lesões, permitindo que intervenções mais invasivas sejam realizadas apenas quando necessárias. Recentemente ampliamos os estudos para as neoplasias de pênis associadas a HPV, que exibem alta morbidade e mortalidade.

Uma outra abordagem para a busca de biomarcadores tumores e alvos com implicações no diagnóstico, prognóstico e terapia dos tumores relacionados ao HPV, envolve a tecnologia de 'peptide phage display'. Este consiste no enriquecimento de sequências peptídicas expressas em bacteriófagos com afinidade por um determinado alvo através de alguns ciclos de incubação com o tecido alvo e re-expansão dos fagos contendo as sequências selecionadas através de infecção de bactérias (FIGURA 8).

Figura 8. Representação esquemática dos ciclos de enriquecimento utilizando o método de phage display (fonte: CM Almeida e AP Lepique, ICB-USP)

Um dos projetos em andamento, o método de phage display foi utilizado a partir de uma biblioteca do bacteriófago M13 que expressa cerca de 10^{13} peptídeos circulares (7 resíduos de aminoácidos) diferentes em sua superfície (proteína *pIII*). O 'panning' foi feito com cultura de linhagens celulares com e sem HPV, tumores causados por HPV em camundongos, e biopsias de tecido cervical normal ou com lesões de alto grau da cérvix uterina. Os fagos enriquecidos nos experimentos foram isolados, sequenciados e empregados em ensaios de ligação de fagos a tumores, que foram detectados por método de imunohistoquímica. Diversos peptídeos foram purificados, aguardando análises mais detalhadas. O padrão de expressão molecular de células e tecidos pode ser decifrado com o auxílio de moléculas específicas do tecido tumoral, como anticorpos, fragmentos de anticorpos, peptídeos e nanopartículas (ZHANG et al., 2012).

Além dos tumores de colo do útero, estamos estudando tumores de cabeça e pescoço, uma vez que este tipo tumoral constitui um dos tipos de câncer mais comuns no mundo, resultando em uma mortalidade de mais de 300.000 casos anuais. Seus principais fatores etiológicos, o consumo excessivo de álcool e tabaco e a presença do HPV, definem subgrupos tumorais com diferentes características moleculares, patológicas e clínicas. Entretanto, a falta de procedimentos terapêuticos específicos para estes tumores se reflete em uma sobrevida menor que 50% após 5 anos do diagnóstico. Os alvos moleculares destes peptídeos serão identificados através de análises bioinformáticas, bioquímicas ou ensaios em larga escala. A presente proposta poderá contribuir significativamente para a identificação de moléculas que apresentem potencial terapêutico/diagnóstico para tumores de cabeça e pescoço.

VI – CONCLUSÃO

Há abundante literatura sobre as elevadas frequências de infecções por HPV, principalmente entre jovens mulheres e homens de qualquer idade, sendo que o câncer ocorre em uma minoria dos indivíduos expostos. Isto implica que as infecções pelos tipos de HPV de alto risco são causa necessária do câncer do colo uterino, mas não suficiente, sendo necessários outros fatores para seu desenvolvimento. Estas afirmações dispararam uma série de estudos que conduzimos sobre diferentes aspectos da oncogênese por HPV, do envolvimento de diferentes variantes de HPV em neoplasia cervical (e mais recentemente em outros tumores) e, principalmente, na elucidação da história natural das infecções por HPV, através de estudos epidemiológicos prospectivos que demonstraram que o risco de câncer é maior para as mulheres que apresentam infecções persistentes, o que corresponde a aproximadamente 10% de todas as infecções. Além disso, participamos do maior estudo multicêntrico de história natural das infecções por HPV em homens – o estudo HIM – que vem gerando resultados originais e muito interessantes sobre HPV em região genital, anal e oral de homens de São Paulo, Mexico e Estados Unidos da América.

Os resultados obtidos nos últimos 20 anos serviram de base para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os tipos mais prevalentes de HPV, que estão provocando redução das infecções e doenças causadas por HPV nos países que já implementaram esta profilaxia primária altamente eficaz. Caminhamos em direção à erradicação de algumas infecções e doenças causadas por HPV, o que poderá ser observado nos próximos 10-15 anos, à dependência da cobertura vacinal, da faixa etária de vacinação e da oferta da vacina para homens. Enquanto avançamos na melhoria das modalidades de prevenção e de sua oferta à maioria da população, é muito importante que se continue na busca de novas terapias para os tumores causados por HPV.

Referências Bibliográficas

Agarwal SM, Raghav D, Singh H, Raghava GP. CCDB: a curated database of genes involved in cervix cancer. *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. D975-D979, 2010.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32 Suppl 1:S1-S6, 2005.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 25;401(1):70-9, 2010.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:796-802,1995.

Brasil. Instituto Nacional do Câncer. **Plano de ação para redução da incidência e mortalidade por câncer do colo do útero: sumário executivo.** Rio de Janeiro – INCA, 2010.

Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, *et al.* Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nature Genetics* 40, n.6, p.722-729, 2008.

Castellsagué X, Sanjosé S, Aguardo T, Louie KS, Bruni L, Muñoz J, *et al.* HPV and cervical cancer in the 2007 report. *Vaccine* 25 Suppl 3:C1-230, 2007.

Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, Krishna S. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol.*78(11):5934-45, 2004.

Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, *et al.* Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX Lyon: IARC Scientific Publications; 2007.

de Oliveira CM, Fregnani JH, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer* 24;13:357, 2013

Derkey CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope.* 2008;118(7):1236-47.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virol.** 324: 17-27, 2004.

Franco E, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J.* 9:348-359,2003.

Frazer I. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol.** 4(1):46-54. 2004.

Giordano R.J.; Cardó-Vila M.; Lahderanta J.; Pasqualini R.; Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nature Med.* 7,n.11, p.1249-1253, 2001.

Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Jolles E, Nielson CM, Baggio ML, Silva R, Quiterio M. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17: 2036-2043, 2008.

Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jul;15(7):1262-7.

IARC Working Group. (2007) Human papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Vol. 90. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Colo do útero. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_utero/definicao>. Acesso em: 26 dez. 2012.

McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Biochemical and functional interactions of human papillomavirus proteins with polycomb group proteins. *Viruses.* 2013 14;5(5):1231-49

Moody CA, Laimins LA Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug;10(8):550-60

Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J. Virol.* 75:5559-5566,2001.

Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, Iversen OE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgrén K, von Krogh G, Lehtinen M, Paavonen J, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Esser MT, Vuocolo SC, Saah AJ, Barr E. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine.* 2007

Read TR, Hocking JS, Chen MY, Donovan B, Bradshaw CS, Fairley CK. The near disappearance of genital warts in young women 4 years after commencing a national human papillomavirus (HPV) vaccination programme. *Sex Transm Infect.* 2011 Dec;87(7):544-7

- Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K53-61.
- Sichero L & Villa LL. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:707-717,2006.
- Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*, 117, n. 2 Suppl, p. S5-10, 2010.
- Stanley M, Pinto LA, Trimble C Human papillomavirus vaccines--immune responses.. *Vaccine* 30 Suppl 5:F83-7, 2012.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*, 458, n.7239, p.719-724, 2009.
- Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R Jr, *et al.* Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Medical Genomics*. 1, 29, 2008.
- Tran B, Dancey JE, Kamel-Reid S, McPherson JD, *et al.* Cancer Genomics: Technology, Discovery, and Translation. *Journal of Clinical Oncology*, 30, n.6, 647-660, 2012.
- WHO. Human papillomavirus and HPV vaccines: technical information for policy-makers and health professionals. Geneva: WHO Press; 2007.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil.; 2007 [updated 2007; cited 2009 21/02/2009]; Available from: www.who.int/hpvcentre.
- WHO. World Health Organization. National cancer control programmes – policies and managerial guidelines. – 2nd. Ed. Geneva – WHO, 2002.
- Witten D, Tibshirani R, Gu SG, Fire A, Lui WO. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. *BMC Biology*, 8, 58, 2010.
- Yuan CH, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, 18;4(12):3831-50 2012.
- Zhao W, Chow LT, Broker TR. Transcription activities of human papillomavirus type 11 E6 promoter-proximal elements in raft and submerged cultures of foreskin keratinocytes. *J. Virol.* 71:8832-8840,1997.
- ZHANG,W.J.; SUI,Y.X.; BUDHA,A.; ZHENG,J.B.; SUN,X.J.; HOU,Y.C.; WANG,T.D.; LU,S.Y. Affinity peptide developed by phage display selection for targeting gastric cancer. *World J Gastroenterol* 18 (17), p.2220, 2012.
- Zuna RE, Tuller E, Wentzensen N, Mathews C, Allen RA, Shanesmith R, Dunn ST, Gold MA, Wang SS, Walker J, Schiffman M. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infect. Agent Cancer*. 6: 19, 2011.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer 2:342-350,2002.

Zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. Virology J, 384, n.2, p. 260-265, 2009.

Deixo esta mensagem final aos meus amados sobrinhos

Sergio, Silvia e Renato, e minhas sobrinhas-netas **Laura, Julia e Gabriela**,

e àqueles que pacientemente aceitaram (e eventualmente

perdoaram) minhas constantes ausências.

Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão...

Que vale a pena se doar às amizades e às pessoas ...

Que a vida é bela, sim, e que eu sempre dei o melhor de mim...

E que valeu a pena!