

AVALIAÇÃO FARMACOGENÓMICA DO CANCRO DO COLO UTERINO

Estudo dos Polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T na Progressão da Doença e Resposta à Terapêutica

Inês Couto Hilário Soldin da Silva



Dissertação de Mestrado em Oncologia
2011

*Science is an imaginative adventure of the mind seeking truth
in a world of mystery.*

Sir Cyril Herman Hinshelwood (1897-1967)

Inês Couto Hilário Soldin Silva

AVALIAÇÃO FARMACOGENÓMICA DO CANCRO DO COLO UTERINO

Estudo dos Polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T na Progressão da Doença e Resposta à Terapêutica

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Oncologia submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto.

Orientador - Professor Doutor Rui Manuel de
Medeiros Melo Silva

Categoria - Professor Associado Convidado
com Agregação

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar da Universidade do Porto

São parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos em publicação

- Hilário Silva I., Catarino R., Medeiros R., 2011. The role of *XRCC1* in repairing DNA - A cancer's review, a preparar submissão
- Hilário Silva I., Nogueira-Silva C., Figueiredo T., Lombo L., Faustino I., Catarino R., Nogueira A., Pereira D., Medeiros R., 2011. Linking *GGH* -401C>T polymorphism to chemotherapy response and survival in advanced cervical cancer, submetido a: *Gynecologic Oncology*

Comunicação em poster:

- Hilário Silva I., Nogueira-Silva C., Figueiredo T., Lombo L., Faustino I., Catarino R., Nogueira A., Pereira D., Medeiros R., Linking *XRCC1* Arg399Gln and *GGH* -401C>T Polymorphisms to Cervical Cancer Risk
The European Multidisciplinary Cancer Congress, ECCO 16: Estocolmo, 23-27 de Setembro de 2011

Agradecimentos	XIX
Lista de Abreviaturas	XXI
Resumo	XXIX
Abstract	XXXIII
1. Introdução	
1.1 Biologia Molecular do Cancro	3
1.2 Variabilidade Genética Individual: Polimorfismos e Cancro	5
1.3 Vírus e Cancro	6
1.3.1 Papiloma Vírus Humano	8
1.3.2 Ciclo de Vida de Papiloma Vírus Humano	11
1.4 Cancro do Colo Uterino	14
1.4.1 Anatomo-Fisiologia do Colo Uterino	14
1.4.2 Epidemiologia do Cancro do Colo Uterino	16
1.4.3 Prevenção da Infecção e Neoplasia do Colo Uterino	17
1.4.4 Papiloma Vírus Humano como Agente Etiológico do Cancro do Colo Uterino	20
1.4.5 Tratamento do Cancro do Colo Uterino	27
1.5 Estudo dos Polimorfismos <i>XRCC1</i> Arg399Gln e <i>GGH</i> -401C>T	32
1.5.1 Reparação do DNA – Via <i>Base Excision Repair</i>	33
1.5.2 O Gene <i>XRCC1</i> e o Polimorfismo <i>XRCC1</i> Arg399Gln	35
1.5.3 Metabolismo do Folato	38
1.5.4 O Gene <i>GGH</i> e o Polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T	41
2. Objectivos	47
3. Material e Métodos	
3.1 Caracterização da População	51
3.2 Procedimentos Laboratoriais	54
3.2.1 Extracção de DNA Genómico	54
3.2.2 Genotipagem dos Polimorfismos <i>XRCC1</i> Arg399Gln e <i>GGH</i> -401C>T	55

3.3 Análise Estatística	56
4. Resultados	
4.1 Análise do Polimorfismo <i>XRCC1</i> Arg399Gln	61
4.1.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Susceptibilidade a Cancro do Colo Uterino	61
4.1.2 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimiorradioterapia com Cisplatina	62
4.2 Análise do Polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T	63
4.2.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Susceptibilidade a Cancro do Colo Uterino	63
4.2.2 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimiorradioterapia com Cisplatina	65
5. Discussão dos Resultados	
5.1 Distribuição das Frequências Genotípicas dos Polimorfismos <i>XRCC1</i> Arg399Gln e <i>GGH</i> -401C>T em Populações Controlo	70
5.2 Análise do Polimorfismo <i>XRCC1</i> Arg399Gln	72
5.2.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Susceptibilidade a Cancro do Colo Uterino	72
5.2.2 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimiorradioterapia com Cisplatina	76
5.3 Análise do Polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T	79
5.3.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Susceptibilidade a Cancro do Colo Uterino	79
5.3.2 Anti-Contraceptivos Orais e Risco Neoplásico	85
5.3.3 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimiorradioterapia com Cisplatina	86
6. Conclusão e Perspectivas Futuras	93
7. Referências Bibliográficas	99

Figura 1	Seis propriedades distintivas das células tumorais	4
Figura 2	Modelo genético e epigenético da carcinogénese actualmente aceite	5
Figura 3	Representação do genoma de HPV-16 e função das respectivas proteínas	9
Figura 4	(A) Forma episomal do DNA viral; (B) Regiões de integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. Embora pouco comum, é possível a co-existência da forma integrada e episomal do genoma de HPV na célula hospedeira	12
Figura 5	Vias de imortalização celular mediadas pela interacção E7-pRb e E6-p53	14
Figura 6	Estimativa da incidência do cancro do colo uterino em 2008	16
Figura 7	Representação esquemática de um corte do epitélio cervical ilustrando a progressão de uma infecção por HPV e principais modelos de intervenção primária e secundária. Da intervenção primária fazem parte as vacinas profiláticas e compostos de quimioprevenção utilizados na prevenção da doença, bem como os testes de rastreio Papanicolau e de HPV que permitem a identificação precoce de lesões intra-epiteliais LSIL e HSIL (<i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i> e <i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>). Após o estabelecimento da infecção, são utilizados no tratamento da neoplasia cervical a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Está em estudo a viabilidade da imunoterapia	18
Figura 8	Ilustração de um corte do epitélio cervical após infecção por HPV. (A) Progressão de lesões CINI-CINIII relativamente à invasão epitelial por HPV e (B) caracterização do ciclo de vida viral	24
Figura 9	Cortes histológicos do epitélio cervical representando diferentes etapas da evolução displásica a neoplasia	26

Figura 10	Representação esquemática do estadiamento tumoral do carcinoma do colo uterino, considerando a localização e extensão tumoral	27
Figura 11	Alguns mecanismos de resistência à cisplatina	32
Figura 12	Representação esquemática das sub-vias <i>short-patch</i> BER (A-E) e <i>long-patch</i> BER. A via <i>short-patch</i> BER, activa pelo reconhecimento de dano numa base no DNA, caracteriza-se pela acção do complexo XRCC1-polymerase β (POL β) na reparação da lesão e inserção de um nucleótido na cadeia de DNA danificada (D). A via <i>long-patch</i> BER é activa na remoção de nucleótidos reduzidos (H). O local abásico resultante é corrigido pela adição de 2-15 nucleótidos (J), cujo excesso é removido pela enzima flap-endonuclease 1 (FEN1)	35
Figura 13	Gene <i>XRCC1</i> e respectiva proteína. Em cima, representa-se a estrutura do gene <i>XRCC1</i> e os três polimorfismos mais frequentes (frequência>0.05) Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln em cada um dos respectivos exões. Em baixo, representa-se a proteína XRCC1 e os principais domínios proteicos essenciais à reparação do DNA. Junto a cada um dos domínios, representam-se as proteínas da via BER com as quais XRCC1 interage na reparação do dano e cuja interacção pode ser modificada pela presença destes SNPs	37
Figura 14	Metabolismo do folato. (A) Os compostos de folato provenientes da dieta são progressivamente metabolizados até à formação das co-enzimas essenciais ao metabolismo do carbono-1: (B) 5,10-metilenotetrahydrofolato (THF) é dador de unidades de 1 carbono na metilação de uridilato (dUMP) a timidilato (dTMP), reacção essencial à síntese da timina; (C) Seguidamente, parte do composto é convertido a 5-metil-THF, vital à síntese das purinas e dador de grupos metil na metilação da homocisteína a metionina. A sua forma activa, S-adenosilmetionina (SAM), actua como principal dador de grupos metil na metilação das ilhotas CpG do DNA e outras moléculas bioactivas	40
Figura 15	Representação de um <i>real-time</i> PCR relativo ao SNP <i>GGH</i> -401C>T	56

Figura 16	Representação gráfica da distribuição das frequências do polimorfismo <i>XRCC1</i> Arg399Gln nos grupos de casos e controles	61
Figura 17	Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste <i>Log Rank</i> após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: Análise da influência do polimorfismo <i>XRCC1</i> Arg399Gln	63
Figura 18	Representação gráfica da distribuição das frequências do polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T nos grupos de casos e controles	64
Figura 19	Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste <i>Log Rank</i> após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: Análise da influência do polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T, após agrupamento de genótipos CC/CT Vs TT	65
Figura 20	Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste <i>Log Rank</i> após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: análise do polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T após estratificação da amostra por estadio tumoral; (A) estadio IIB; (B) estadio III	66
Figura 21	Curvas de sobrevivência obtidas por regressão de Cox e respectivo valor de <i>Hazard Ratio</i> após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: análise das variáveis <i>GGH</i> -401TT e estadio tumoral	66

Quadro 1	Vírus humanos com potencial oncogénico	7
Quadro 2	Caracterização da amostra em função das respectivas características demográficas, comportamentais, clínico-patológicas e tratamento primário	52
Quadro 3	Caracterização do subgrupo amostral tratado com quimiorradioterapia, em função do tipo histológico e estadio tumoral	53
Quadro 4	Condições da reacção de <i>real-time</i> PCR utilizadas na genotipagem dos SNPs <i>XRCC1</i> Arg399Gln e <i>GGH</i> -401C>T	56
Quadro 5	Genotipagem dos grupos de casos e controlos relativamente ao risco de cancro do colo uterino: Influência do polimorfismo <i>XRCC1</i> Arg399Gln	62
Quadro 6	Genotipagem dos grupos de casos e controlos relativamente ao risco de cancro do colo uterino: Influência do polimorfismo <i>GGH</i> -401C>T	64
Quadro 7	Análise comparativa da frequência do alelo variante 399A entre diferentes etnias	71

Agradecimentos

Ao longo destes dois anos de trabalho, grande parte da minha abordagem relativamente à doença oncológica e ao próprio paciente, mudou.

Devo esta significativa e importante mudança ao Professor Doutor Rui Medeiros, orientador deste projecto, pela sua paciência e dedicação. Dele partem ideias e soluções que sempre incentivam e ajudam a continuar. Disposto a ouvir e a ajudar, o seu apoio foi motivador para que o meu trabalho chegasse a bom porto.

À Doutora Raquel Catarino pelo que aprendi com ela e com os seus comentários, observações e interpretações, críticas construtivas que fez aos diferentes trabalhos que compõem esta tese.

À Comissão Directiva do Mestrado em Oncologia representada pelo Professor Carlos Lopes, pela disponibilidade demonstrada e disponibilização dos meios necessários à realização deste projecto.

À Dra. Deolinda Pereira pelo apoio clínico concedido. À Dra Cristina Nogueira-Silva, Dra. Ilda Faustino, Dra. Liliana Lombo, Dr. Tiago Figueiredo e Augusto Nogueira pelo auxílio prestado na recolha de dados para que a realização desta tese fosse possível.

Como de grande motivação e confiança sempre se fez o ambiente de que me rodearam, agradeço, obviamente, aos meus pais o seu contínuo incentivo e suporte, o infindável apoio que me deram para que alcançasse o maior sucesso possível. Tudo o que com eles aprendi até chegar aqui, a sua amizade e, acima de tudo, a sua dedicação, paciência e perspicácia. Ao seu orgulho e ao seu tempo traduzido em horas para que as minhas múltiplas viagens entre Lisboa e o Porto se traduzissem nesta tese e tudo o que ela trouxe consigo.

Ao meu avô e à sua infinita curiosidade. Ao seu enorme interesse pela Ciência e por todas as suas “espantosas descobertas”, para as quais tanto me despertou o

interesse. Ao seu contínuo apoio, amizade e dedicação.

À minha família que sempre mostrou um enorme interesse por cada nova etapa que se vai construindo, dedicou um apoio constante a cada uma delas e mostrou enorme alegria por cada sucesso alcançado. Foram, alguns deles pela sua atitude, uma verdadeira motivação.

Ao Carlos pela sua amizade, dedicação, enorme curiosidade e preocupação para que tudo esteja sempre a correr bem, para que sempre aproveite o máximo e o melhor que ainda esteja para vir.

Como peça fundamental deste quadro, falta apenas acrescentar os meus amigos. Todos eles, de Sintra a Aveiro e ao Porto. Locais inesquecíveis com pessoas diferentes, todos deixaram já a sua marca no meu percurso de vida até aqui. Desde a partilha dos momentos mais alegres ao desabafo dos mais difíceis, a ansiedade pela última novidade, todos esses momentos tiveram já a sua passagem pela minha vida. Pela sua amizade, por compreenderem as minhas ausências se estou longe, pelas saudades que demonstram quando essa ausência é mais prolongada e faz, assim, notar que, apesar de estarmos longe, continuamos a partilhar as mesmas preocupações e alegrias.

Acima de tudo, ao sorriso que todos demonstram em jeito de “boa sorte” quando uma nova etapa se aproxima.

Lista de Abreviaturas

A

A – Adenina

ACO – Anti-contraceptivos orais

APE - Apurinic/aprimidinic endonuclease

Arg - Arginina

B

BER – *Base excision repair*

BRCA1 - Breast cancer susceptibility protein type 1

BRCT – *BRCA1 susceptibility protein C-terminal domain*

C

C - Citosina

CCR – Cancro colo-rectal

CHO – *Chinese hamster ovary cells*

CIN – *Cervical intraepithelial neoplasia*

CIS – *Carcinoma in situ*

Ck2 - Casein kinase 2

CPNPC – Cancro de pulmão de não pequenas células

Cis – Cisteína

D

dNTP's – Desoxinucleotidos-trifosfato

dTMP - Timidilato

dUMP - Uridilato

E

E - *Early*

E6-AP – E6-associated protein

E2F1 - E2F transcription factor 1

F

FEN – Flap endonuclease

FIGO - *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*

FOLR1 – Folate receptor 1

FPGS – Folylpolyglutamate synthase

5-FU – 5-Fluoracil

G

G - Guanina

GGH – *Gamma-Glutamyl Hydrolase*

Gln - Glutamina

H

His - Histidina

HPV – Human *Papillomavirus*

HR – *Hazard ratio*

HR-HPV – High-risk human *papillomavirus*

HSIL – *High-grade squamous intraepithelial lesion*

I

IC – Intervalo de confiança

ILP – Intervalo livre de progressão

L

L – *Late*

LIG – Lygase

LLA - Leucemia linfóide aguda

LR-HPV – Low-risk human *papillomavirus*

LSIL – *Low-grade squamous intraepithelial lesion*

M

MMR – *Mismatch repair*

mRNA – *Messenger ribonucleic acid*

MTHFR - Metylenetetrahydrofolate reductase

MTX - Metotrexato

N

NER – *Nucleotide excision repair*

NLS – *Nuclear localization signal*

NTD – *N-terminal domain*

O

OR – *Odds ratio*

P

PARP - Poly (ADP-ribose) polymerase

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen

PCR – *Polymerase chain reaction*

PNK – Polynucleotide kinase

POL – Polymerase

R

Rb - *Retinoblastoma*

RFC1 – Reduced folate carrier 1

rpm - Rotações por minuto

S

SAM – *S-adenosylmethionine*

SBV - Sobrevivência

SNP - *Single nucleotide polymorphism*

SSBR – *Single-strand break repair*

T

T – Timina

THF – Tetrahidrofolato

Tir - Tirosina

U

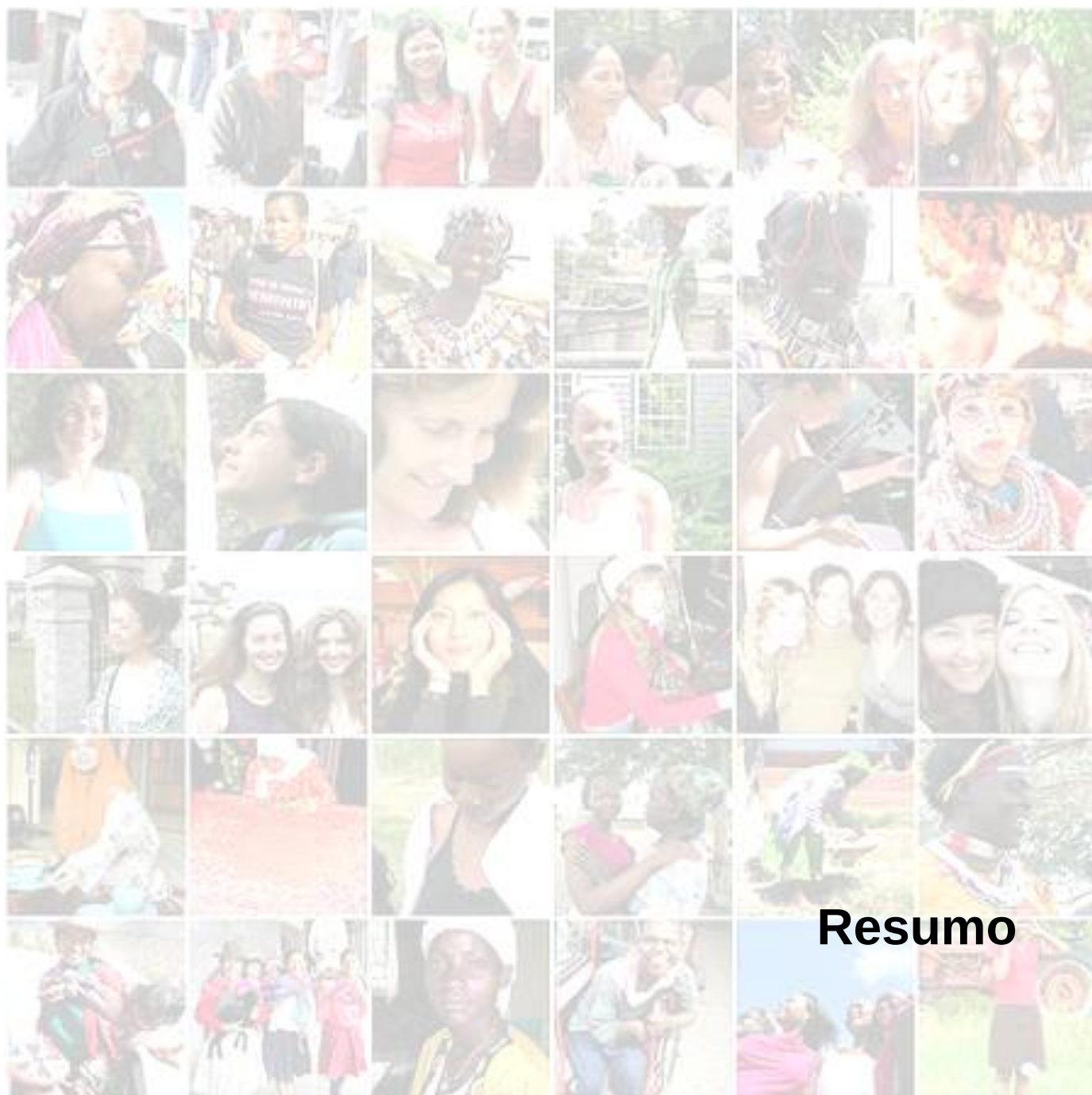
UTR – *Untranslated region*

V

VLP – *Viral like particles*

X

XRCC1 - *X-ray repair cross complementing group 1*



Resumo

Nas últimas décadas, a epidemiologia do cancro do colo uterino tem sofrido importantes alterações. Uma queda acentuada na respectiva incidência traduz a cada vez maior implementação e aceitação das medidas de rastreio e diagnóstico precoce actualmente disponibilizadas em larga escala.

A neoplasia cervical representa um dos modelos neoplásicos mais bem estudados até hoje. Não apenas devido à significativa relação causal identificada entre esta e o vírus oncogénico Papiloma Vírus Humano (HPV), mas também pelo fácil acesso da região do colo uterino aos métodos de rastreio, diagnóstico precoce e tratamento. No entanto, sabe-se que HPV é, apesar de um elemento fundamental ao desenvolvimento da neoplasia cervical, insuficiente à progressão de uma displasia cervical a neoplasia. Na tentativa de identificar os restantes elementos envolvidos neste complexo processo multifactorial, têm vindo a ser recentemente estudados genes de baixa penetrância, designadamente genes envolvidos em vias de reparação do DNA e manutenção da estabilidade genómica. Estes, entre outros estudos, apontam o importante papel que as respectivas variantes podem desempenhar na modulação da susceptibilidade celular aos agentes carcinogénicos ou terapêuticas anti-neoplásicas. Os polimorfismos genéticos, elementos fundamentais da variação genética inter-individual, são, assim, elementos determinantes desta grande variabilidade inter-individual no desenvolvimento da doença e posterior resposta à terapêutica. A sua tipagem é, por isso, importante na localização de regiões genómicas moduladoras do risco e evolução da doença.

Subsequentemente, este estudo analisou o risco de cancro do colo uterino e variação da resposta ao tratamento associados a um polimorfismo num gene de reparação do DNA, *X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1)* Arg399Gln. A variação 399 Arginina→Glutamina pode associar-se a uma alteração conformacional da proteína XRCC1 e, conseqüentemente, a uma menor eficiência da via *base excision repair* na reparação do DNA. Pode, assim, e de acordo com dados descritos na literatura, associar-se a maior risco para cancro e, paralelamente, ao prolongamento da actividade de drogas pró-apoptóticas usadas na quimioterapia, como agentes alquilantes e respectivos derivados, nomeadamente cisplatina.

Adicionalmente, procurou-se conhecer a influência da variação *Gamma Glutamyl Hydrolase (GGH)* -401C>T envolvida no metabolismo do folato, não apenas sobre a evolução da neoplasia do colo uterino, mas também sobre a relação com a cisplatina utilizada no modelo de tratamento primário destes tumores. De acordo com a literatura, a depleção das reservas de folato intra-celulares, designadamente causada pela sobre-expressão da enzima GGH, é consistentemente detectada em todas as fases de displasia pré-neoplásica até ao desenvolvimento de carcinoma. Devido ao papel do folato como

co-factor em reacções do metabolismo dos grupos de 1 carbono, síntese *de novo* de grupos metil e crescimento e replicação celular normais, a sua contribuição para o desenvolvimento neoplásico e variação da resposta à terapia com platinos não pôde ser excluída.

Particularmente, o estudo desenvolvido teve como objectivo primordial estudar a relação dos polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T com o risco de cancro do colo uterino e a resposta à quimioradioterapia com cisplatina. Pretendia-se comparar a frequência dos polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T numa amostra de mulheres com cancro cervical, relativamente a um grupo de mulheres sem patologia conhecida, bem como comparar a frequência de ambos os polimorfismos no grupo controlo analisado, relativamente a outras populações controlo. Tendo em consideração cada uma das vias metabólicas em que se integram, procurou-se conhecer a influência de ambas as variações no risco de neoplasia cervical, assim como na resposta ao tratamento. Para tal, desenvolveu-se um estudo caso-controlo analisando amostras de DNA de quinhentos e oitenta e uma (581) mulheres com neoplasia do colo uterino e trezentos e quarenta e quatro (344) indivíduos controlo, sem doença oncológica conhecida.

Para a genotipagem dos polimorfismos recorreu-se à técnica *Real-time* PCR.

No que se refere à variação *XRCC1* Arg399Gln, a análise dos resultados não revelou diferenças com significado estatístico ($p>0.05$). Portadoras do alelo A apresentaram, contudo, um período de sobrevivência global superior a mulheres de genótipo GG, e ambas uma taxa de sobrevivência aos 5 anos $\geq 70\%$.

Relativamente ao polimorfismo *GGH* -401C>T, este revelou associação estatisticamente significativa com a sobrevivência global de mulheres portadoras da variação *GGH* -401T ($p=0.035$). Mulheres portadoras do genótipo variante têm, assim, uma taxa de sobrevivência aos 5 anos 20% superior à de mulheres de genótipo CC/CT. Não houve, contudo, associação com o risco de lesão ou neoplasia do colo uterino ($p>0.05$).

Nenhum dos polimorfismos mostrou associação com a sobrevivência livre de progressão, o que pode ser devido à reduzida amostragem de mulheres apresentando recidiva tumoral (N=9).

Considerando a grande disparidade de resultados disponibilizada na literatura, estes resultados poderão ajudar a clarificar o papel que cada um destes polimorfismos pode ter no desenvolvimento, progressão e evolução da neoplasia do colo uterino.



Abstract

In the last decades, cervical cancer statistics have suffered important changes. A high drop in its incidence reflects a higher implementation and acceptance of the screening and early diagnosis techniques, which are largely available nowadays.

Cervical cancer is, actually, one of the most studied and well-known cancer models. Not only due to the significant causal relationship between cervical cancer development and the oncogenic Human *Papillomavirus* (HPV), but also because of the easy access of the cervical region to screening, early diagnosis and therapeutic procedures. Although it is known that HPV is an essential element for carcinogenesis, it is not sufficient. Trying to discover the other elements that are involved in this complex and multifactorial process, low-penetrance genes have been studied. They can either be involved in DNA repair pathways or in the maintenance of genomic stability. Many studies have been trying to shed some light on the importance of genetic polymorphisms and inter-individual variability in modulating genotoxins susceptibility, cancer risk and treatment response. As some of the genetic polymorphisms' variants are low-penetrance risk alleles, they might be linked to disease mechanisms and its outcome. Because of this, its typing is so important.

Subsequently, this study analyzed the role of the DNA repair polymorphism *X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1)* Arg399Gln. The variation 399 Arginine→Glutamine might induce a conformational change in the XRCC1 protein and, consequently, change its ability to interact with other repair proteins in base excision repair pathway. According to the literature, not only a higher cancer risk might be found, but also a higher effect of alkylating drugs should be noted in variant cells.

In addition, we tried to identify the influence of the variant *Gamma Glutamyl Hydrolase (GGH)* -401C>T from folate metabolism in cancer evolution and cisplatin tumor response. In agreement with published reports, depletion in folate intracellular reserves, namely caused by the variant genotype, is consistently detected in all cervical cancer stages, from cervical intra-epithelial neoplasia till invasive cervical cancer. As folate is essential for the majority of one-carbon metabolism reactions and *de-novo* methyl synthesis, cell replication and growing, the contribution of its depletion for cervical cancer could not be excluded. In addition, it was already reported that this polymorphism could act together with the variant *XRCC1* Arg399Gln in determining cervical cancer treatment response.

As a result, this study intended to analyze the relationship between both polymorphisms and cervical cancer risk and outcome. Studying that, we intended to compare the polymorphic frequencies between a group of healthy subjects and a group of people with cervical disease, as well as to compare our control-subjects frequencies with

the ones of other control populations. Additionally, considering every different pathways in which each polymorphism participates, we tried to identify what is the influence of each variant in cancer susceptibility and cisplatin-based chemoradiotherapy response.

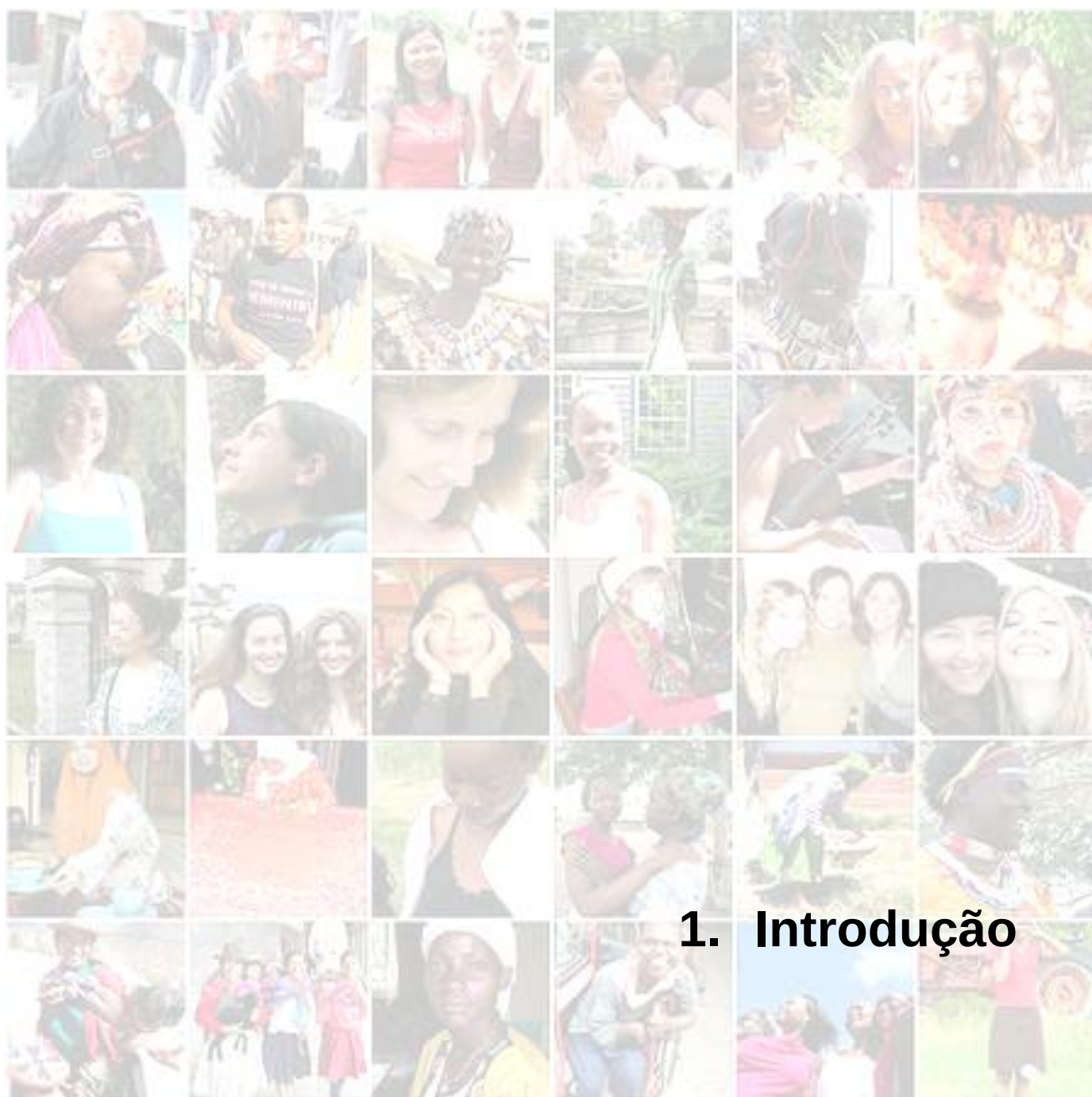
So, we performed a case-control study with DNA samples from five hundred and eighty one (581) women with cervical neoplasia and three hundred and forty four (344) samples from women without oncologic disease. Genotyping was performed using a Real-time PCR technique.

As far as the *XRCC1* Arg399Gln variant is concerned, our analysis did not show a statistically significant difference ($p>0.05$). However, women carrying the variant A allele showed a better survival rate than women with the GG genotype, and both presented a 5-year survival rate $\geq 70\%$.

Relatively to the *GGH* -401C>T polymorphism, we verified that it was significantly correlated with the 5-year survival rate of women carrying the variant allele T being treated with cisplatin ($p=0.035$). Furthermore, Kaplan-Meier curves showed that women carrying the TT genotype could live longer than women carrying the C allele in a difference of 20%. No statistically significant association was found between the variant genotype and cancer risk ($p>0.05$).

Neither of the polymorphisms was linked to progression free survival, which could be due to the very small number of people relapsing in the sample analyzed ($N=9$).

Considering inconsistencies in literature, these results could help us to clarify the role of each polymorphism in cervical cancer development, progression and outcome.



1. Introdução

1.1 Biologia Molecular do Cancro

Uma estimativa para o ano 2008 previa o diagnóstico de 12.7 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo, 56% dos quais registados em países em desenvolvimento. Dados relativos à mortalidade, mostram uma estimativa de 7.6 milhões de mortes pela doença, 63% das quais em regiões menos desenvolvidas (Ferlay, J. *et al.*, 2010). A neoplasia surge, assim, logo após as doenças cardiovasculares como uma das principais causas de morte mundiais.

Contudo, a transformação neoplásica requer múltiplas mutações e outras alterações concomitantes numa mesma célula. Por isso, a probabilidade de conversão de uma célula normal num clone neoplásico é extremamente reduzida. Apenas uma em cada três células normais deve originar uma neoplasia. Embora algumas das respectivas vias biológicas sejam conhecidas, muitos dos respectivos factores causais ainda continuam por esclarecer. O seu processo de desenvolvimento multifactorial e multifásico designa-se carcinogénese e tem implicações tanto ao nível genético como fenotípico (Lamprecht, S. A. and Lipkin, M., 2003; Kumar, V. *et al.*, 2007; Kawakami, K. *et al.*, 2008). Tendo por base danos não letais no DNA, herdados ou adquiridos ao longo da vida, o tumor maligno resulta da lenta e contínua acumulação de alterações genéticas e epigenéticas em genes determinantes da estabilidade celular, designadamente genes reguladores do crescimento celular, apoptose e reparação do DNA (Kumar, V. *et al.*, 2007). Para que o fenótipo maligno se desenvolva, será necessária a acumulação de variações em genes distintos, responsável pelo aumento gradual da malignidade (Kumar, V. *et al.*, 2007). A iniciação, resultado da exposição celular a agentes ambientais, químicos, físicos ou biológicos, pode desencadear dano genómico permanente e aumentar a probabilidade de formação de um tumor a partir da célula exposta. Embora seja uma condição necessária, a iniciação não é suficiente ao desenvolvimento neoplásico. Para tal, é necessária a exposição de células “iniciadas” sem capacidade de reparação do dano genómico à acção de agentes promotores num curto intervalo de tempo, o que aumenta a sua capacidade proliferativa e a respectiva instabilidade genómica. Esta corresponde, por sua vez, a uma série de alterações cromossómicas que, afectando as populações celulares derivadas do mesmo precursor ancestral, aumentam a sua taxa de mutação e lhes permitem desenvolver fenótipos de adaptação à pressão selectiva ambiental (Sadikovic, B. *et al.*, 2008). A acumulação sequencial de alterações em genes essenciais à regulação da estabilidade celular culmina, consequentemente, na expansão clonal da célula “iniciada”.

Apesar da natureza pleiotrópica dos tumores, algumas das suas propriedades são

1. Introdução

partilhadas pela quase totalidade das neoplasias. A auto-suficiência relativamente a factores de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios do desenvolvimento celular provenientes do microambiente, potencial replicativo ilimitado, angiogénese e metastização sustentadas e capacidade de evasão à apoptose estão entre elas. Estas seis características celulares, adquiridas e alteradas nas células malignas durante a carcinogénese, constituem as *hallmarks* da malignidade (Figura 1). A imunovigilância e alteração do *status* de metilação do DNA, a qual pode conferir vantagem selectiva adicional ao tumor, são também características de algumas populações de células tumorais (Loktionov, A., 2004; Cheng, Q. *et al.*, 2006; Sadikovic, B. *et al.*, 2008).

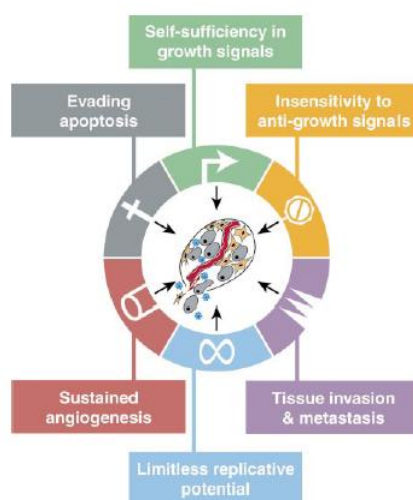


Figura 1 - Seis propriedades distintivas das células tumorais (Hanahan, D. and Weinberg, R. A., 2000).

Sequencialmente, a fase de progressão tumoral permite a evolução de lesões com propriedades benignas a neoplasmas malignos. Este período de evolução neoplásica caracteriza-se pelo aumento da heterogeneidade tumoral, associada ao aumento do seu potencial maligno. Estas alterações decorrem da acumulação progressiva e independente de várias mutações em diferentes células, gerando clones com diferentes propriedades de crescimento, invasão, metastização ou resposta às drogas anti-neoplásicas (Kumar, V. *et al.*, 2007). Deste modo, apesar de, em cada etapa do desenvolvimento, só um clone de células ser geneticamente alterado, ao momento de diagnóstico o tumor é extremamente heterogéneo e formado por diversas linhagens. Por isso, o desenvolvimento neoplásico não depende apenas de uma alteração inicial numa célula original, mas de múltiplas alterações subsequentes e complementares (Figura 2) (Loktionov, A., 2004; Michor, F. *et al.*, 2004; Kumar, V. *et al.*, 2007). São a mutação e

1. Introdução

instabilidade genómica decorrentes deste processo que propiciam ao tumor diversidade suficiente para que as respectivas células apresentem vantagem selectiva de crescimento e evoluam de acordo com o modelo Darwiniano da evolução (Sadikovic, B. *et al.*, 2008). Um paralelismo entre o desenvolvimento tumoral e o modelo de evolução das espécies proposto por Darwin tem sido explorado. Múltiplas evidências têm sugerido que o desenvolvimento neoplásico resulta da pressão selectiva executada por estímulos ambientais e hereditários (Little, M. P., 2010). A estas variações devem juntar-se outras, produzindo um efeito de selecção natural favorecedor dos clones celulares com maior capacidade de replicação e sobrevivência em microambientes hostis (Little, M. P., 2010; Cooke, S. L. *et al.*, 2011). A neoplasia é, assim, um sistema biológico dinâmico e evolutivo, cuja heterogeneidade facilita a sobrevivência das células transformadas.

Embora não seja ainda conhecido o número exacto de alterações necessárias ao desenvolvimento neoplásico, prevê-se que este varie com o tipo de alteração e modelo tumoral (Hahn, W. C. *et al.*, 1999).

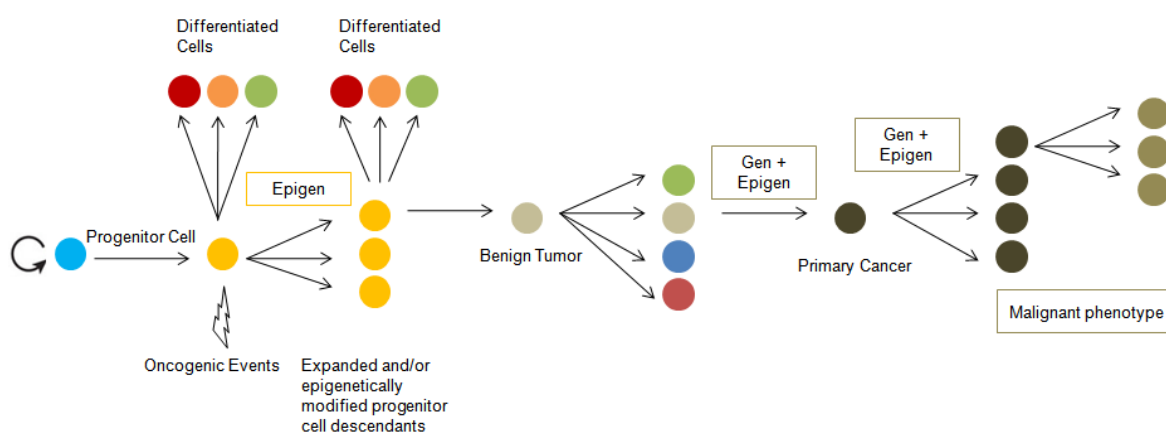


Figura 2- Modelo genético e epigenético da carcinogénese actualmente aceite; Epigen – Alterações epigenéticas; Gen + Epigen – Actuação combinada de alterações genéticas e epigenéticas; Adaptado de (Feinberg, A. P. *et al.*, 2006).

1.2 Variabilidade Genética Individual: Polimorfismos e Cancro

A neoplasia esporádica é a mais comum. Os genes que lhe conferem maior risco são definidos como genes de susceptibilidade, cujas variações, polimorfismos, fazem variar a probabilidade de uma neoplasia se desenvolver (Shen, M. R. *et al.*, 1998). Polimorfismos são variações na sequência de DNA cujo alelo menos frequente ocorre em pelo menos 1% da população (Kelada, S. N. *et al.*, 2003; Le, W. *et al.*, 2005). *Single*

1. Introdução

nucleotide polymorphisms (SNPs) são, por sua vez, variações que ocorrem num único nucleótido e correspondem à forma mais comum dos polimorfismos. Estima-se que existam 3-4 SNPs por gene, podendo localizar-se nas regiões codificantes de proteínas, regiões intrónicas, região 5' ou 3' ou região não transcrita do gene (Kelada, S. N. *et al.*, 2003; Farkasova, T. *et al.*, 2008). Embora geralmente silenciosos, os polimorfismos podem ser, também, funcionantes e associados a diferentes padrões de expressão fenotípica do mesmo gene, daí que a sua tipagem seja importante na localização de regiões genómicas moduladoras do risco de cancro e outras patologias (Yin, J. *et al.*, 2002; Farkasova, T. *et al.*, 2008). A importância da sua identificação é, adicionalmente, justificada pelo facto de alguns alelos de susceptibilidade para cancro serem polimórficos e ocorrerem frequentemente em genes de reparação do DNA e manutenção da integridade genómica, controlo da proliferação e diferenciação celular, e metabolismo de agentes carcinogénicos. Estes são alelos comuns e de baixa penetrância, associados ao aparecimento de neoplasias tardias, condicionamento da resposta à terapêutica e sobrevivência. Como o risco de doença condicionado isoladamente por cada um destes genes é baixo, estima-se que seja a interacção de múltiplos alelos variantes na mesma via biológica a ser responsável pelo respectivo efeito. Embora o seu impacto no risco individual para cancro seja baixo, estes são geralmente relevantes no cálculo do risco atribuível numa população, o qual corresponde à porção de incidência da doença na população que é devida à exposição e que, por isso, pode ser eliminada caso o factor exposição seja abolido (Hennekens, C. H. *et al.*, 1988). Estes alelos assumem, assim, grande impacto na área da saúde pública, também devido à sua elevada frequência na população em geral (Hu, J. J. *et al.*, 2001; Kelada, S. N. *et al.*, 2003; Farkasova, T. *et al.*, 2008). A integração de indivíduos de alto risco em esquemas de prevenção da doença poderá, por isso, vir a ser equacionada.

Devido à elevada variabilidade inter-individual e diferente prevalência destes SNPs em diferentes etnias, torna-se importante considerar o grupo étnico da população ao estudar a relação dos polimorfismos com a incidência e mortalidade do cancro. Um factor de susceptibilidade numa população poderá não representar um factor de risco noutra população (Hu, Z. *et al.*, 2005).

1.3 Vírus e Cancro

Estima-se que os vírus se associem a 15-20% das neoplasias humanas. Os vírus oncogénicos pertencem, maioritariamente, a cinco principais famílias virais (Quadro 1) e

1. Introdução

são, na sua maioria, ubíquos. Ao longo do tempo desenvolveram propriedades de evasão ao sistema imunitário humano, o que lhes permite sobreviver no interior da célula hospedeira e explicar a ocorrência de neoplasia após longos períodos de latência viral. No entanto, na maior parte dos indivíduos infectados, mecanismos imunológicos eficazes são, por um lado, responsáveis pela eliminação da infecção, permanecendo o indivíduo assintomático e a infecção subclínica ou, por outro, pela restrição da infecção viral a um subgrupo de células infectadas. A carga viral não é, assim, suficiente ao desenvolvimento imediato de uma neoplasia. Por isso, a incidência da infecção é muito superior à incidência neoplásica (Zur Hausen, H., 2001; Javier, R. T. and Butel, J. S., 2008). A infecção por HPV ilustra bem esta realidade. Uma infecção assintomática (transitória ou intermitente) pode ser detectada em 5%-40% das mulheres em idade reprodutiva, das quais apenas uma reduzida percentagem apresentará o mesmo genótipo de HPV em posteriores citologias (Franco, E. L. *et al.*, 2001). O estudo do potencial oncogénico viral tem contribuído para a identificação de múltiplas vias biológicas da neoplasia, cujo silenciamento ou activação actuam como co-factores da infecção viral no desenvolvimento neoplásico. A sua identificação tem, ainda, contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, preferencialmente dirigidas ao vírus. Esta terapêutica dirigida pretende ultrapassar a inespecificidade inerente ao tratamento convencional e aumentar a sua efectividade (Javier, R. T. and Butel, J. S., 2008).

Quadro 1 - Vírus humanos com potencial oncogénico; Adaptado de (Zur Hausen, H., 2001; Javier, R. T. and Butel, J. S., 2008).

Família Viral	Papel na Neoplasia Humana		Neoplasia
	Aceite	Potencial	
<i>Adenoviridae</i>	-	Subgrupos B, C, D	-
<i>Retroviridae</i>	HTLV-1	-	Linfoma; Leucemia de células-T no adulto
<i>Papillomaviridae</i>	HR-HPV	LR-HPV	Colo uterino e região anogenital; Pele; Subtipos de carcinoma da cabeça e pescoço
<i>Polyomaviridae</i>	-	SV40, BKV, JCV	-
<i>Hepadnaviridae</i>	HBV	-	Hepatocelular
<i>Flaviridae</i>	HCV	-	Hepatocelular; Linfoma
	KSHV, HHV-8	-	Sarcoma de Kaposi
<i>Herpesviridae:</i> <i>γ- Herpesviridae</i>	EBV	-	Linfoma de Burkitt; Linfoma de Hodgkin; Linfoma imunoblástico; Carcinoma da nasofaringe

HTLV-1, Human T-cell leukemia virus type-1; HR-HPV, High-risk human *papillomavirus*; LR-HPV, Low-risk human *papillomavirus*; SV40, Simian vacuolating virus 40; BKV, BK virus; JCV, JC virus; HBV, Hepatitis B

1. Introdução

virus; HCV, Hepatitis C virus; KSHV, Kaposi's sarcoma-associated *herpesvirus*; HHV-8, Human *herpesvirus* 8; EBV, Epstein-Barr vírus

1.3.1 Papiloma Vírus Humano

O virologista Harold zur Hausen estabeleceu pela primeira vez em 1974 uma relação causal entre a infecção genital por Papiloma Vírus Humano (HPV) e o desenvolvimento de carcinoma cervical (zur Hausen, H. *et al.*, 1974). Como HPV é, comparativamente aos restantes vírus oncogénicos, responsável pelo maior número de neoplasias induzidas por vírus e apresenta, adicionalmente, um modelo único de carcinogénese, este tornou-se o modelo neoplásico de carcinogénese viral mais bem definido até hoje. De forma pouco comum, HPV restringe-se ao local da infecção em detrimento de uma infecção sistémica (Javier, R. T. and Butel, J. S., 2008).

HPV é um vírus pequeno, não envelopado, de DNA de cadeia dupla (Burd, E. M., 2003; Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Putral, L. N. *et al.*, 2005). Possui um genoma circular e um capsídeo icosaédrico onde se encontram as duas proteínas da cápside L1 e L2. Devido à ausência de invólucro membranar externo, os viriões possuem reduzida antigeneidade (Jo, H. and Kim, J. W., 2005).

O genoma viral ilustrado na Figura 3 está funcionalmente dividido em três domínios: Duas regiões codificantes de proteínas (E - *early* e L - *late*) e uma região regulatória não-codificante (*UTR - untranslated region*), onde se encontram as sequências reguladoras da replicação do DNA viral. A região de expressão precoce do genoma é formada por 6 *open reading frames* (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) envolvidas na oncogénese e replicação viral. A região de expressão tardia codifica as duas proteínas estruturais da cápside viral, L1 e L2 (Burd, E. M., 2003; Jo, H. and Kim, J. W., 2005).

1. Introdução

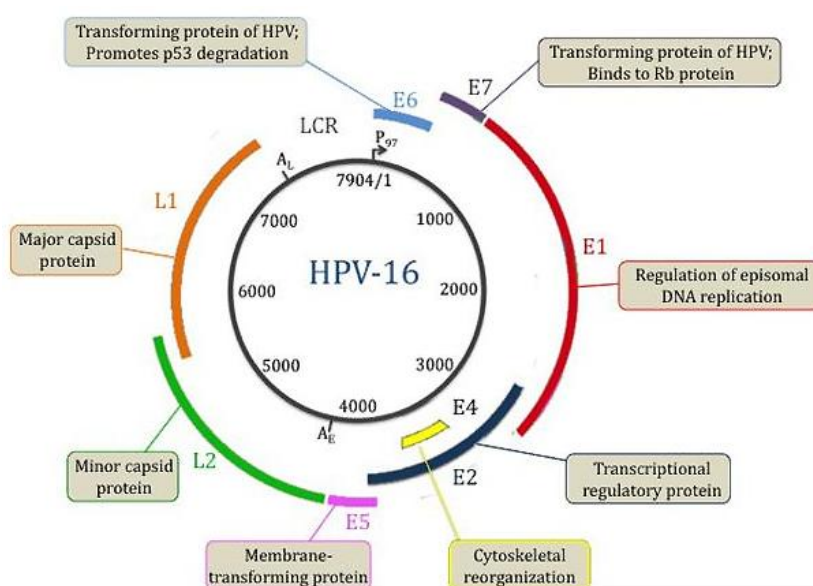


Figura 3 – Representação do genoma de HPV-16 e função das respectivas proteínas (Lin, K. *et al.*, 2010).

Este é um vírus espécie e tecido-específico (Stanley, M. A. *et al.*, 2007) exclusivamente epiteliotrópico que infecta selectivamente dois tipos de epitélio. Genótipos de HPV epidermotrópico infectam o epitélio queratinizado da pele, desencadeando lesões epiteliais hiperplásicas, verrugas e papilomas. O epitélio não queratinizado das membranas mucosas é maioritariamente afectado por genótipos de mucosa responsáveis pela infecção do tracto anogenital e respiratório, mucosa delimitante da boca e orofaringe (Burd, E. M., 2003; Grm, H. S. *et al.*, 2009). Consoante a frequência e força de associação a cancro cervical e outros tumores malignos, lesões invasivas ou de alto grau, estes genótipos são divididos em genótipos de baixo, intermédio ou alto risco, designados *low-risk* HPV (LR-HPV) e *high-risk* HPV (HR-HPV) (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001; Grm, H. S. *et al.*, 2009). Diferenças no respectivo grau de agressividade e risco de indução de carcinogénese são, essencialmente, devidas a diferenças funcionais entre os genótipos de LR-HPV e HR-HPV. Não apenas diferem as sequências codificantes das oncoproteínas E6 e E7, como também genótipos de HR-HPV codificam, adicionalmente, a oncoproteína E5, implicada na transformação maligna da célula hospedeira e evasão ao sistema imunitário (Castle, P. E. *et al.*, 2006).

Dos mais de 200 genótipos identificados, mais de 15 são HR-HPV e destes, 30-40 genótipos infectam o tracto anogenital. Entre eles encontram-se HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 70. Os genótipos conhecidos foram definidos em função da homologia do DNA viral (Doorbar, J., 2006). Para a sua classificação, as estirpes virais dividem-se em diferentes grupos e géneros, associados a lesões com diferentes

características (Castle, P. E. *et al.*, 2006; Doorbar, J., 2006). Os dois principais géneros são α e β . Enquanto o género β inclui, essencialmente, genótipos causadores de infecções cutâneas, inaparentes em humanos, ou indutores de cancro de pele não melanoma em indivíduos imunocomprometidos (Castle, P. E. *et al.*, 2006; Doorbar, J., 2006), aproximadamente 40 tipos de HPV integrados em 15 espécies α infectam a mucosa epitelial. Pensa-se que seja em cinco destas espécies, principalmente α -7 e α -9, que virtualmente todos os genótipos de HR-HPV estejam integrados (Castle, P. E. *et al.*, 2006; Doorbar, J., 2006).

HPV-16 é o genótipo de HR-HPV mais prevalente, correspondendo a mais de 50% das infecções e carcinomas espinocelulares (Doorbar, J., 2006). Encontrado em 50%-70% dos casos de carcinoma cervical, este é o mais importante agente etiológico da neoplasia do colo uterino e suas lesões precursoras. A frequência à qual HPV-16 é encontrado integrado no genoma do hospedeiro aumenta com a severidade da lesão (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006). Uma correlação directa entre a carga viral de HPV-16 e a severidade da lesão foi descrita, pois esta correlaciona-se com a progressão de lesões CINII a CINIII e com a persistência destas lesões pré-malignas (Giuliano, A. R. *et al.*, 1997; Burd, E. M., 2003; Roden, R. and Wu, T.-C., 2006). HPV-18 está presente em 7%-20% das neoplasias cervicais. Contrariamente a HPV-16, cuja forma episomal pode ser encontrada em lesões invasivas, HPV-18 encontra-se maioritariamente sob a forma integrada nas lesões avançadas CINIII e neoplasia invasiva. Geralmente associado ao aparecimento de adenocarcinoma e carcinoma indiferenciado de pequenas células, as lesões HPV-18+ são lesões de progressão mais rápida e os tumores fenotipicamente mais agressivos (Medeiros, R. *et al.*, 2005). Ambos os genótipos se associam, contudo, ao desenvolvimento de lesões intra-epiteliais pré-neoplásicas CINI-III, bem como de carcinoma invasivo (Medeiros, R. *et al.*, 2005; Roden, R. and Wu, T.-C., 2006; Stanley, M. A. *et al.*, 2007; Woodman, C. B. J. *et al.*, 2007). O fenótipo de uma infecção por HR-HPV depende, não apenas do genótipo de HPV e do epitélio infectado, mas também de factores do hospedeiro reguladores da persistência viral, possibilidade de regressão da infecção ou latência viral. A extensão da invasão além da superfície epitelial depende do grau da lesão e genótipo infeccioso (Doorbar, J., 2006).

Os genótipos de LR-HPV mais frequentes são HPV-1, 6, 11, 42-44 e associam-se, maioritariamente, à formação de lesões intra-epiteliais de baixo grau, lesões benignas da epiderme, verrugas anogenitais (*condyloma acuminatum*) ou infecção de outros epitélios que raramente progridem para cancro (Franco, E. L. *et al.*, 2001; Doorbar, J., 2006). Ocasionalmente, estes genótipos são associados a neoplasias em mucosas, pois apesar

de diferentes genótipos apresentarem tropismo tecidual diferente, estes têm capacidade de infecção de locais aparentemente não óptimos (Castle, P. E. *et al.*, 2006; Doorbar, J., 2006).

A Organização Mundial de Saúde sugere ainda outra classificação para os genótipos de HPV, de acordo com a qual o vírus é classificado segundo genótipos carcinogénicos (HPV-16, HPV-18), provavelmente carcinogénicos (HPV-31, HPV-33) e possivelmente carcinogénicos (outros genótipos de HPV, excepto HPV-6 e HPV-11) (Franco, E. L. *et al.*, 2001).

1.3.2 Ciclo de Vida de Papiloma Vírus Humano

O ciclo de vida de HPV inicia-se com o acesso do vírus ao interior da célula hospedeira presente na camada basal, através de microtraumas ou abrasão do epitélio estratificado, visto que a replicação viral depende da constante divisão celular (Lin, K. *et al.*, 2010). Seguidamente, o vírus entra frequentemente num período de quiescência de 2-12 meses após a infecção inicial, durante o qual permanece latente no citoplasma devido à reduzida carga viral (Doorbar, J., 2006; Stanley, M. A. *et al.*, 2007).

O ciclo de vida de HPV pode, assim, ser dividido em duas fases sequenciais, designadamente não produtiva e produtiva (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Doorbar, J., 2006; Grm, H. S. *et al.*, 2009). Numa primeira fase não produtiva logo após a infecção, inicia-se a expressão dos genes virais de expressão precoce *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, enquanto o genoma de HPV permanece sob a forma de epissoma no interior das células basais. Estas permitem a replicação do DNA viral e consequente amplificação genómica. O número de cópias virais por célula aumenta, assim, para 50-100 cópias de HPV por célula. Nesta fase, o vírus utiliza a maquinaria celular para a replicação viral. A baixa expressão dos oncogenes *E6* e *E7* é regulada por *feedback* negativo pelos repressores transcricionais *E1* e *E2*, cuja expressão constitutiva é fundamental à manutenção da infecção (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Doorbar, J., 2006; Grm, H. S. *et al.*, 2009). Nesta fase do ciclo de vida viral, a actividade mitótica das células basais, parcialmente anormal, surge como característica recorrente da malignidade e lesões pré-malignas (Burd, E. M., 2003). Na presença de condições ambientais óptimas, as células infectadas da camada basal migram para a superfície epitelial, onde o vírus dá continuidade ao seu ciclo de vida (Burd, E. M., 2003). É na camada superior do epitélio que os genes virais de expressão tardia são activos e a taxa de replicação viral aumenta. Nas células supra-basais inicia-se o ciclo de vida produtivo, caracterizado pela replicação e amplificação genómica

1. Introdução

adicionais (Doorbar, J., 2006; Grm, H. S. *et al.*, 2009). Aqui, devido à integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, a integridade do genoma de HPV é quebrada em locais frágeis do DNA *downstream* aos genes *E6-E7* (Figura 4). Esta associa-se à perda ou disfunção do gene *E2*, e consequente sobre-expressão das oncoproteínas *E6* e *E7*. Porque as células supra-basais são terminalmente diferenciadas, *E6* e *E7* estimulam a sua reentrada na fase S do ciclo celular, a reactivação da síntese de DNA e a inibição da apoptose, de modo a assegurar a replicação viral nestas. A replicação activa intra-nuclear assegura, assim, ao vírus a produção de novas partículas virais através do empacotamento do DNA viral em capsídeos e formação de *viral like particles* (VLPs) na camada externa do epitélio. No final do ciclo de vida viral os novos viriões são libertados a partir da submucosa (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Doorbar, J., 2006; Grm, H. S. *et al.*, 2009). O culminar do ciclo de vida de HPV associa-se à formação de uma lesão CIN I (Figura 8).

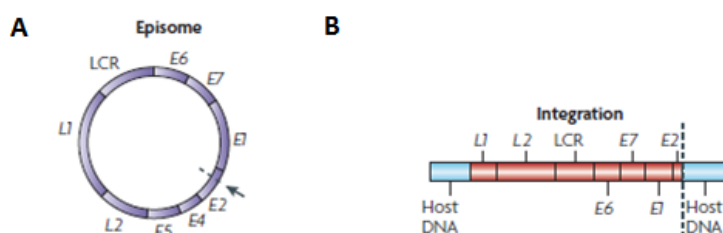


Figura 4 – (A) Forma episomal do DNA viral; (B) Regiões de integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. Embora pouco comum, é possível a co-existência da forma integrada e episomal do genoma de HPV na célula hospedeira; Adaptado de (Woodman, C. B. J. *et al.*, 2007).

A integração do genoma de HPV é uma etapa crítica na carcinogénese, de frequência variável com o genótipo de HPV. Contrariamente ao HPV-16, a integração de HPV-18 parece virtualmente completa em mulheres com CINIII ou doença invasiva (Woodman, C. B. J. *et al.*, 2007). A integração do genoma viral justifica-se pela dependência da replicação viral relativamente aos factores de transcrição do hospedeiro, bem como pela necessidade de transcrição de *E6* e *E7* para evasão ao sistema imunitário e transformação maligna. Enquanto a integração do DNA viral não ocorre, as células infectadas não são reconhecidas como tal (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Doorbar, J., 2006; Grm, H. S. *et al.*, 2009). Este é, por isso, o mais importante factor ao aparecimento de lesões pré-neoplásicas. Está, normalmente, associado a uma vantagem selectiva de crescimento das células infectadas por HPV e, consequentemente, a pior prognóstico e resistência à terapêutica (Woodman, C. B. J. *et al.*, 2007).

Genótipos de HR-HPV têm, contrariamente aos genótipos de LR-HPV, capacidade de integração no genoma do hospedeiro (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Doorbar, J., 2006; Grm, H. S. *et al.*, 2009). É a presença das oncoproteínas E6 e E7 que permite ao HR-HPV inactivar os genes supressores tumorais *p53* e *retinoblastoma (Rb)* e, assim, interferir com a função celular normal e imortalizar a célula infectada (Ledwaba, T. *et al.*, 2004). Para tal, a proteína E7 associa-se à proteína pRb hipofosforilada, impedindo-a de sequestrar o factor de transcrição E2F-1 e induzindo a sua degradação via sistema ubiquitina-proteossoma. Esta oncoproteína associa-se, ainda, à proteína p130 reguladora da diferenciação celular, activando factores de transcrição necessários à replicação do DNA nas células infectadas (Figura 5) (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Grm, H. S. *et al.*, 2009). O seu papel oncogénico é predominante no cancro cervical, embora a sua expressão esteja também aumentada na lesão cervical intra-epitelial (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Grm, H. S. *et al.*, 2009).

Nos genótipos de baixo risco a proteína E7 difere num aminoácido relativamente à mesma oncoproteína de HR-HPV (genótipos de LR-HPV apresentam uma glicina no local de um ácido aspártico em genótipos de HR-HPV) e apresenta, por isso, 10x menor afinidade para a pRb (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001; Bharti, A. C. *et al.*, 2009). Consequentemente, numa infecção por LR-HPV, a acção de E7 é restrita à proteína p130 (Grm, H. S. *et al.*, 2009). A sua actividade transformante é complementada pela proteína E6, cuja co-expressão com E7 aumenta a efectividade de transformação maligna das células. A sua acção é fundamentalmente desempenhada nas lesões cutâneas, onde actua na prevenção da apoptose após a reentrada das células em fase S mediada por E7 e inactiva a proteína p53 para perda da resposta ao dano genético (Jo, H. and Kim, J. W., 2005). Para tal, E6 forma um complexo tripartido com o complexo ubiquitina-proteína ligase E6-AP e a p53, promovendo a sua degradação proteolítica via ubiquitina-proteossoma e aumentando a instabilidade genómica nas lesões pré-neoplásicas (Figura 5). Contudo, em infecções por LR-HPV, p53 não chega a ser degradada porque a ligação E6-p53 tem menor afinidade e/ou a proteína E6 menor capacidade de induzir a sua degradação (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Grm, H. S. *et al.*, 2009).

A neoplasia cervical é, assim, única relativamente à maior parte dos tumores sólidos, pois nesta a função de p53 é alterada pela presença da oncoproteína E6, enquanto nos restantes a inactivação de p53 resulta de uma mutação no próprio gene (Koivusalo, R. *et al.*, 2002).

1. Introdução

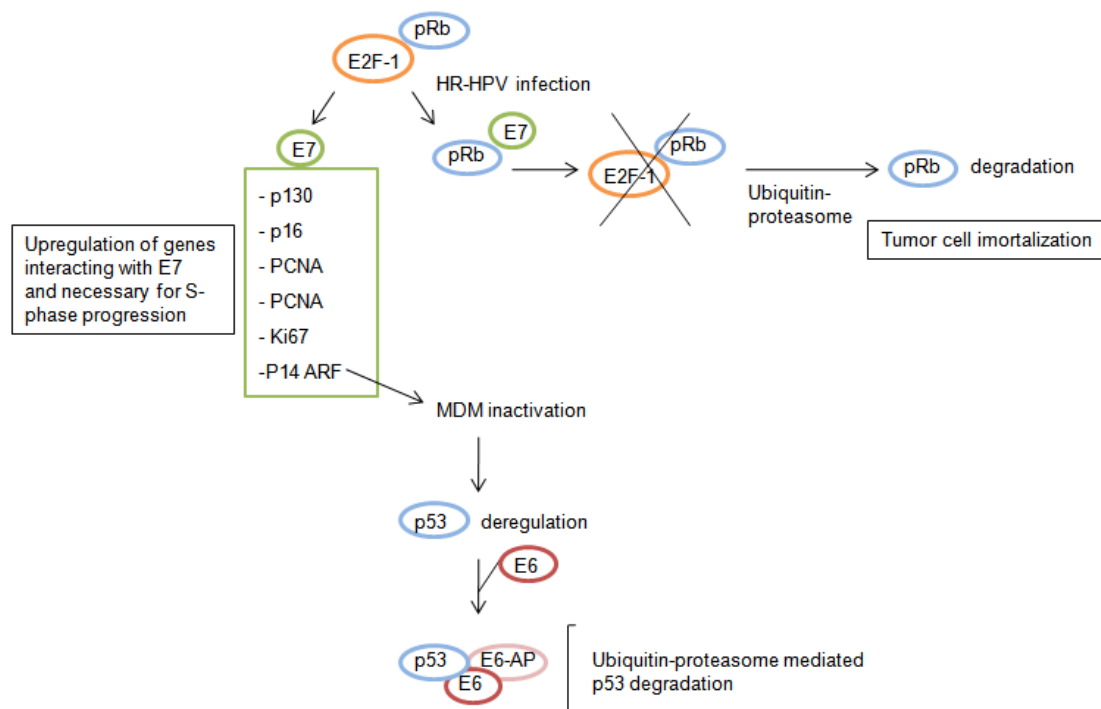


Figura 5- Vias de imortalização celular mediadas pela interação E7-pRb e E6-p53; Adaptado de (Loktionov, A., 2004).

4 Cancro do Colo Uterino

1.4.1 Anatomo-Fisiologia do Colo Uterino

O colo uterino é a região mais inferior e estreita do útero. Apresenta uma forma cônica ou cilíndrica e é formado pelo ectocérvis e endocérvis, orifícios interno e externo do útero. Para além do estroma de suporte, o colo uterino é revestido pela mucosa, miométrio e perimétrio. A mucosa delimitante das glândulas cervicais compreende o epitélio colunar e é designada endocérvis (ASCC).

O adenocarcinoma, subtipo de carcinoma cervical mais agressivo, e correspondente a 10%-15% dos casos de carcinoma cervical, tem origem neste epitélio colunar simples ou glandular. Cobre uma extensão variável de ectocérvis e o canal endocervical. O endocérvis é formado por apenas uma camada de células colunares ou *reserve cells* secretoras de mucina encontradas na camada basal, e glândulas endocervicais (ASCC; Ledwaba, T. *et al.*, 2004). Pensa-se que as *reserve cells* da camada basal sejam a principal fonte de células estaminais do colo uterino, cuja capacidade de auto-replicação e diferenciação em qualquer tipo celular após estímulo por reguladores do ciclo celular se preserva (Ledwaba, T. *et al.*, 2004).

Relativamente ao epitélio pavimentoso ectocervical, este reveste externamente o colo uterino e é pluriestratificado. É formado por células dispostas em camadas profunda (célula basais e parabasais pequenas), intermediária e superficial (células descamantes) com diferenciação crescente da membrana basal em direcção à superfície (ASCC). As células basais imaturas do estrato basal, caracterizadas por intensa actividade mitótica, são as únicas com capacidade de divisão neste epitélio, a partir do qual se forma o carcinoma cervical espinocelular, correspondente a 75% dos casos de carcinoma cervical (ASCC). Embora outros subtipos histológicos possam ser diagnosticados, nomeadamente tumores adenopavimentosos, estes são modelos raros nesta neoplasia (Fauci, A. S. *et al.*, 2008).

Outra região histológica cervical é a junção escamo-colunar, localizada próximo da abertura cervical para a vagina. Cobre uma extensão variável de tecido consoante a idade, paridade, estadio hormonal e reprodutivo da mulher (Elson, D. A. *et al.*, 2008). Devido a um processo dinâmico de remodelação epitelial, formam-se a partir desta região duas diferentes junções escamo-colunares. A junção escamo-colunar original assinala, desde a fase de desenvolvimento embrionário, a separação do epitélio pavimentoso ectocervical do epitélio colunar endocervical. A nova junção escamo-colunar, funcional ou fisiológica, resulta de um processo de remodelação dinâmica que ocorre durante a vida reprodutiva da mulher. Este fenómeno metaplásico permite a substituição de mucosa glandular por escamosa devido à presença de células estaminais e actividade metaplásica (ASCC; Ledwaba, T. *et al.*, 2004). É a diferente intensidade da metaplasia que faz variar a probabilidade de infecção por HPV, tornando-a mais frequente na puberdade e durante a primeira gravidez quando a actividade metaplásica é mais intensa, declinando após a menopausa (ASCC; Burd, E. M., 2003).

Fenómenos metaplásicos foram descritos como a etapa inicial do desenvolvimento carcinogénico a partir da zona de transformação, uma região epitelial formada por epitélio pavimentoso metaplásico, compreendida entre a nova junção escamo-colunar e a junção escamo-colunar original. É a partir da zona de transformação que a maioria das neoplasias cervicais tem origem, tendo sido já identificado especial tropismo de HPV pelas *reserve cells* desta região epitelial (ASCC; Elson, D. A. *et al.*, 2008). Este tipo de epitélio de transição não é, contudo, exclusivo do cérvix. Também está presente no tracto aerodigestivo e anogenital onde, conseqüentemente, a infecção pode ocorrer (Doorbar, J., 2006; Lie, A. K. and Kristensen, G., 2008). O vírus associa-se ainda ao aparecimento de neoplasia vulvar, vaginal, do pénis e a um subconjunto de neoplasias da cabeça e pescoço (Doorbar, J., 2006; Roden, R. and Wu, T.-C., 2006).

1.4.2 Epidemiologia do Cancro do Colo Uterino

O carcinoma do colo uterino constitui ainda hoje um problema de saúde mundial. Esta foi, em 2008, a terceira neoplasia mais comum no sexo feminino e a terceira causa de morte por cancro na mulher. Ilustra-se na Figura 6 a respectiva incidência mundial em 2008. O facto de mais de 85% dos novos casos de doença serem diagnosticados em países em desenvolvimento, onde contabiliza 13% das neoplasias no sexo feminino, pode ser potencialmente explicado por factores relacionados com a elevada taxa de paridade ou baixa prática de rastreio, factores relativos à dieta ou significativas variações étnicas (Franco, E. L. *et al.*, 2001; Ferlay, J. *et al.*, 2010). Contudo, a relação entre a elevada prevalência dos genótipos genitais de HPV na população e o elevado risco de infecção durante a vida, mostram que a incidência de cancro cervical na população é baixa. Enquanto em países com elevada taxa de cancro cervical a prevalência da infecção ronda 10-20%, nos países com baixa taxa de cancro cervical a prevalência da infecção é de apenas 5-10% (Doorbar, J., 2006; Ginecologia, S. P., 2007).

Embora há alguns anos esta fosse a principal causa de morte por cancro na mulher, nas últimas décadas a sua incidência e mortalidade diminuíram significativamente. Este padrão decrescente deve-se, maioritariamente, à maior acessibilidade e/ou disponibilidade do teste de rastreio Papanicolau e consequente maior acessibilidade ao diagnóstico precoce, melhoria da terapêutica e condições sócio-económicas da população, assim como, à redução das taxas de fertilidade (Franco, E. L. *et al.*, 2001; Ledwaba, T. *et al.*, 2004). Outros factores determinantes da mortalidade em diferentes populações relacionam-se com a proporção relativa de pacientes com doença avançada relativamente ao grupo de pacientes com lesão inicial, distribuição de idades das mulheres afectadas e acesso à terapêutica (Society, A. C., 2009).

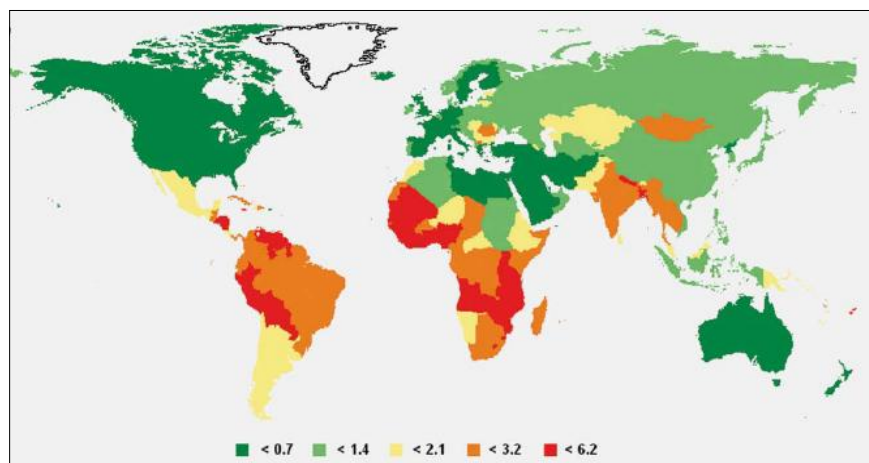


Figura 6 – Estimativa da incidência do cancro do colo uterino em 2008 (Ferlay, J. *et al.*, 2010).

Particularmente em Portugal, e de acordo com dados relativos a 2006, o cancro do colo uterino foi a oitava neoplasia mais comum no sexo feminino (RORENO, 2010). Apesar da progressiva diminuição na incidência desta neoplasia, o número de novos casos tende a aumentar em países desenvolvidos, principalmente entre mulheres Caucasianas. Este aumento deve-se a uma reemergência da infecção por HPV associada a alterações no comportamento sexual ou à imunosenescência viral, a qual deverá permitir a expressão de infecções latentes até então indetectáveis (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004; Roden, R. and Wu, T.-C., 2006). Um dos factores mais problemáticos associados à maior incidência do carcinoma cervical é o sobre-diagnóstico. Este decorre da identificação e tratamento de lesões cervicais potencialmente não neoplásicas, que nunca chegariam a ser identificadas não fossem os mecanismos de rastreio populacional actualmente implementados (Esserman, L. and Thompson, I., 2010). Porque este modelo de saúde implica custos e gasto de recursos excessivamente elevados, assim como a submissão da mulher a maior pressão emocional, a reclassificação destes tumores indolentes e lesões benignas tem sido proposta, sem compromisso da detecção e tratamento da doença. Para tal, urge identificar novos biomarcadores de progressão, assim como factores preditivos e de diagnóstico. Estes devem ser utilizados no momento de rastreio, tornando possível distinguir, de imediato, mulheres com necessidade de diagnóstico e tratamento subsequente, relativamente a mulheres com lesão benigna ou indolente (Esserman, L. and Thompson, I., 2010). Actualmente, estão já em estudo marcadores de proliferação, regulação, diferenciação e outros (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001).

1.4.3 Prevenção da Infecção e Neoplasia do Colo Uterino

O facto de uma infecção por HPV ser causa necessária para o desenvolvimento neoplásico tem importantes implicações na prevenção primária e secundária da neoplasia. A prevenção é, segundo a Organização Mundial de Saúde, a melhor estratégia de controlo do cancro e a mais efectiva a longo-prazo. Técnicas de rastreio e diagnóstico precoce podem ser aplicadas na monitorização do carcinoma do colo uterino, já que o longo estadio pré-cancerígeno de 5-10 anos é detectável ao exame microscópico de rastreio e as células com características anormais, visíveis ao exame citológico, são de fácil acesso a biopsia e tratamento (ASCC; Society, A. C., 2009). Tendo ainda em consideração que os genótipos de HR-HPV estão filogeneticamente correlacionados com HPV-16 ou HPV-18, o controlo da infecção por HPV deverá ser uma etapa essencial à

1. Introdução

erradicação da neoplasia cervical (Medeiros, R. *et al.*, 2005). Para tal, a adopção de comportamentos sexuais seguros constitui uma parte crucial desta prevenção primária.

Nos modelos de prevenção secundária, a citologia cervico-vaginal ocupa um lugar preferencial, pois este modelo de rastreio do cancro do colo uterino é simples, pouco dispendioso e os resultados fiáveis. A par da vacinação profilática, este é um dos principais métodos de prevenção da neoplasia do colo uterino, entre outros modelos de intervenção aplicáveis em diferentes fases da carcinogénese (Figura 7).

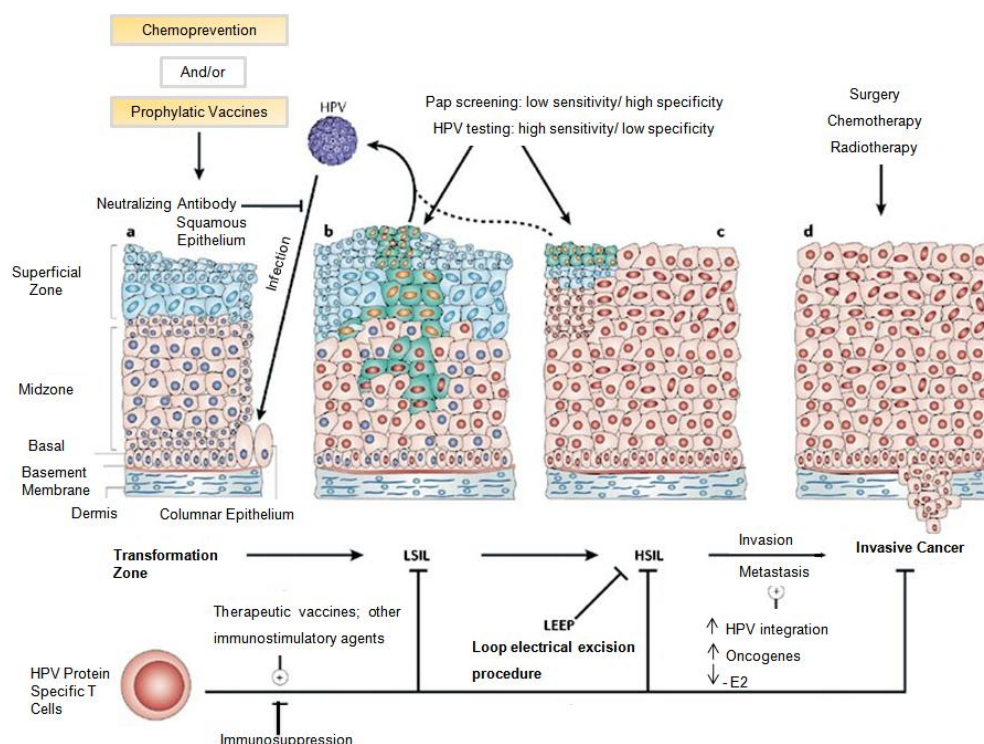


Figura 7 – Representação esquemática de um corte do epitélio cervical ilustrando a progressão de uma infecção por HPV e principais modelos de intervenção primária e secundária. Da intervenção primária fazem parte as vacinas profiláticas e compostos de quimioprevenção utilizados na prevenção da doença, bem como os testes de rastreio Papanicolau e de HPV que permitem a identificação precoce de lesões intra-epiteliais LSIL e HSIL (*low-grade squamous intraepithelial lesion* e *high-grade squamous intraepithelial lesion*). Após o estabelecimento da infecção, fazem parte de uma intervenção secundária a cirurgia, radioterapia e quimioterapia utilizadas no tratamento da neoplasia cervical. Está em estudo a viabilidade da imunoterapia; Adaptado de (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006).

Visto que a doença é induzida por um agente viral e que mulheres infectadas por HPV não demonstram uma resposta imune eficaz, dois tipos de vacinas poderão vir a ser utilizados como estratégia profilática e terapêutica, respectivamente. Vacinas profiláticas ou de primeira geração evitam a entrada do vírus na célula, pois induzem a produção de anticorpos anti-HPV do tipo IgG neutralizantes em níveis superiores aos resultantes de

uma infecção natural (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006; Lin, K. *et al.*, 2010). Como o vírus tem um ciclo de vida exclusivamente intra-celular, a transudação adicional de IgG do soro para as secreções do tracto genital, preferencialmente direccionados ao local dos microtraumas epiteliais, favorece a resposta imune local (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006). É a expressão de L1 ou L2 recombinante que induz a formulação de VLPs altamente imunogénicas, imunológica e morfológicamente semelhantes aos viriões de HPV (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006; Lin, K. *et al.*, 2010). Apesar de mimetizar a estrutura do virião, como estas não possuem material genético, não têm actividade oncogénica. Graças a mecanismos de protecção cruzada relativamente a genótipos semelhantes, estima-se que a vacina bivalente Cervarix®, formada por HPV-16 e HPV-18, assegure protecção contra ~80% dos casos de cancro cervical (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006). Gardasil®, vacina quadrivalente dirigida aos genótipos HPV-6, 11, 16 e 18, é a outra vacina profilática comercialmente disponível (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006; Lin, K. *et al.*, 2010).

As vacinas terapêuticas ou de segunda geração são direccionadas a uma infecção pré-existente e estão, actualmente, em estudo. Estas integram as oncoproteínas E6 e E7 em estado não infeccioso, para que uma resposta imune celular imediata e específica de HPV seja activa, a eliminação da infecção acelerada e novas infecções ou recidivas tumorais evitadas (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006; Lin, K. *et al.*, 2010). De modo a combinar o efeito profilático e terapêutico numa só vacina, o desenvolvimento de uma nova unidade poderá induzir a produção de anticorpos neutralizantes e, simultaneamente, uma resposta imune celular específica de E6 e E7 (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006).

Adicionalmente, tem sido explorado o papel da quimioprevenção na neoplasia do colo uterino, pois a deficiência nutricional foi apontada como um dos principais co-factores à progressão da infecção por HPV (Sedjo, R. L. *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos e alguns ensaios clínicos demonstraram uma acção supressora de certos micronutrientes na infecção por HPV, essencialmente, folato e micronutrientes com ele relacionados. Embora na década de 90 se tenha demonstrado que indivíduos com um baixo consumo de frutas e vegetais apresentam maior risco de cancro comparativamente a outros apresentando um consumo mais elevado, e após controlo para potenciais factores de confundimento, actualmente estes resultados são interpretados com maior precaução. Parte dos estudos é do tipo caso-controlo e utiliza diferentes medidas de avaliação do folato, o que limita a respectiva análise (Key, T. J., 2011).

A relação deficiência nutricional Vs cancro justifica-se, no entanto, em parte pelo efeito protector dos nutrientes antioxidantes na redução do dano oxidativo e/ou aumento

da actividade de enzimas de detoxificação dos agentes carcinogénicos (Key, T. J., 2011). A redução do risco de cancro cervical tem sido, por isso, parcialmente associada ao papel protector dos antioxidantes da dieta, os quais desempenham uma acção supressora selectiva sobre factores de transcrição do hospedeiro (Bharti, A. C. *et al.*, 2009). Entre estes, destacam-se a vitamina C, a vitamina E e os carotenóides, a vitamina B₁₂ e o folato. Porque a vitamina C está, normalmente, presente nos mesmos alimentos que o folato e porque esta protege os folatos da clivagem oxidativa, a utilização combinada destes ou vários micronutrientes deve ter mais impacto que a sua utilização isolada.

A vitamina C, vitamina E e carotenóides regulam a inflamação e potenciam a função imune. Quando presentes em concentrações normais, associam-se à redução do risco de persistência da infecção por HPV através da prevenção da amplificação de genes virais e redução da replicação viral, inibição da activação de oncogenes celulares, activação da função imune e modulação da resposta inflamatória à infecção (Meyskens, F. L. and Manetta, A., 1995; Giuliano, A. R. *et al.*, 1997; García-Closas, R. *et al.*, 2005). Estes previnem, ainda, a formação de aductos de DNA citotóxicos formados após a exposição ao tabaco e outros químicos (García-Closas, R. *et al.*, 2005). O efeito quimioprotector do β -caroteno foi, adicionalmente, descrito sobre a proliferação e diferenciação das células epiteliais, pois baixos níveis de carotenóides favoreceram a progressão da lesão e associaram-se a lesões mais avançadas (Potischman, N., 1993). Apesar de uma associação inversa entre estes e o risco de CIN I e cancro ter sido descrita (Giuliano, A. R. *et al.*, 1997), o folato parece ser o micronutriente mais importante na evolução de neoplasias de origem epitelial, nomeadamente cancro cervical. A vitamina B₁₂, reguladora da absorção celular de folato e elemento de reparação e síntese do DNA, está, por isso, inversamente relacionada com a persistência da infecção por HPV. A suplementação combinada desta com ácido fólico (forma sintética de folato) reduziu, nalguns ensaios clínicos, a probabilidade de formação de CIN III e poderá, assim, vir a integrar esquemas de quimioprevenção da neoplasia do colo uterino (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2009).

1.4.4 Papiloma Vírus Humano como Agente Etiológico do Cancro do Colo Uterino

Caracterizando-se por uma elevada taxa de transmissibilidade, a infecção por HPV é a infecção venérea mais comum, transmitida através do contacto sexual ou outros contactos íntimos da pele ou superfícies mucosas com um parceiro infectado (Franco, E.

L. *et al.*, 2001; Doorbar, J., 2006). Porque o genoma viral não é apenas detectado em amostras de carcinoma cervical, mas também no tecido normal adjacente ou amostras cervico-vaginais de mulheres sem doença, um conjunto de factores do hospedeiro e factores virais, como a carga viral, o genótipo infeccioso e a sua integração no genoma do hospedeiro determinam o risco de infecção por HPV, bem como a probabilidade de esta persistir e progredir até à formação de uma neoplasia. Consideram-se, assim, potenciais factores de risco à infecção por HPV, factores demográficos como a idade e etnia, pois mulheres jovens, negras, hispânicas e nativas americanas têm maior risco de infecção por HPV; reduzido estatuto sócio-económico e padrões comportamentais que, frequentemente, lhe estão associados, designadamente, multiplicidade de parceiros sexuais da própria ou do parceiro, multiparidade (>3 filhos) e idade precoce de início da actividade sexual (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001; Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004; Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Matos, A. *et al.*, 2005; Medeiros, R. *et al.*, 2005; Sousa, H. *et al.*, 2007). A melhoria do estatuto sócio-económico e educacional da população têm demonstrado um efeito positivo no risco de cancro cervical (Jo, H. and Kim, J. W., 2005).

Posteriormente, entre os principais co-factores que influenciam o risco de persistência de uma infecção por HPV e respectiva progressão a displasia cervical contam-se o estilo de vida, nomeadamente tabagismo, consumo de álcool, utilização prolongada de anti-contraceptivos orais; imunodeficiências e deficiências nutricionais; maior dificuldade no acesso aos cuidados de saúde, ou a prática de comportamentos de risco, nomeadamente, a realização de baixo número ou ausência de exame citológico de rotina, a multiparidade e a co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis (Ledwaba, T. *et al.*, 2004; García-Closas, R. *et al.*, 2005; Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Matos, A. *et al.*, 2005). A multiparidade e subsequente lactação podem, ainda, ser importantes factores de risco ao desenvolvimento de neoplasia cervical pela depleção das reservas de folato que lhes está associada (Potischman, N. *et al.*, 1991).

Relativamente à acção do tabaco sobre o risco de progressão de uma displasia a neoplasia do colo uterino em mulheres infectadas por HPV, esta deve-se à acção carcinogénica directa de alguns componentes do tabaco sobre as células do epitélio cervical. Este é, tal como a inflamação, um potente agente oxidante, o que poderá reprimir a função imune local e reduzir a possibilidade de *eliminação* da infecção (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001). O consumo de tabaco está, ainda, associado à depleção das reservas de vitamina C, carotenóides e folato intra-celulares, o que poderá potenciar o desenvolvimento neoplásico (Potischman, N. *et al.*, 1991; Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004).

Vários estudos epidemiológicos têm também estudado o potencial papel dos anti-

contraceptivos orais na carcinogénese cervical. Alguns estudos afirmam que a sua utilização a longo-prazo (>12 anos) aumenta o risco de adenocarcinoma. Referem que uma exposição prolongada da zona de transformação aos anti-contraceptivos orais pode aumentar a capacidade proliferativa destas células e, consequentemente, a sua susceptibilidade ao HPV. A par da estimulação da proliferação celular, pensa-se que a transcrição viral seja acelerada, com base na exposição da zona de transformação ao estrogénio e progesterona. Sequências específicas de ligação aos esteróides foram identificadas em regiões reguladoras da transcrição no DNA viral. Do ponto de vista do hospedeiro, reduzidos níveis de folato intra-celulares foram identificados em mulheres utilizadoras de anti-contraceptivos orais. Uma potencial acção redutora sobre as reservas de folato foi considerada (Butterworth, C. E. *et al.*, 1992; Jo, H. and Kim, J. W., 2005).

A história prévia de doenças sexualmente transmissíveis, nomeadamente herpes simplex vírus 2 ou vírus da imunodeficiência humana, é também um factor facilitador da infecção por HPV e, por isso, um importante factor de risco à progressão neoplásica. Estas infecções, condicionantes de imunodeficiência, podem actuar sinergicamente a HPV para indução da resposta inflamatória e promoção da carcinogénese (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001; Jo, H. and Kim, J. W., 2005).

Por fim, factores genéticos e epigenéticos do hospedeiro podem associar-se ao desenvolvimento neoplásico. Por um lado, a perda de heterozigotia ou activação de proto-oncogenes como *Ha-Ras* e *c-myc* estão entre as alterações genéticas descritas (Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001). Por outro, alterações epigenéticas concomitantes ocorrem frequentemente na inactivação de genes supressores tumorais, conduzindo ao respectivo silenciamento. Adicionalmente, verificou-se que a metilação *de novo* aumenta à medida que a neoplasia progride, o que pode ser entendido como um mecanismo de defesa do hospedeiro supressor da transcrição de DNA exógeno, ou uma estratégia viral para a manutenção da latência infecciosa (Jo, H. and Kim, J. W., 2005; Woodman, C. B. J. *et al.*, 2007).

Apesar da multiplicidade de factores de risco para o desenvolvimento neoplásico, estes apenas actuam como co-carcinogénios, pois por si só não são suficientes para o aparecimento de cancro. Cada co-factor representa, assim, diferentes exposições genéticas ou ambientais. O agente iniciador, causa necessária embora não suficiente, é uma infecção persistente por um genótipo de HR-HPV (Medeiros, R. *et al.*, 1997; García-Closas, R. *et al.*, 2005; Matos, A. *et al.*, 2005; Medeiros, R. *et al.*, 2005; Sousa, H. *et al.*, 2007). Subsequentemente, o DNA viral é detectado em mais de 99% das neoplasias cervicais e 85-100% das lesões pré-neoplásicas, o que torna esta magnitude de associação maior que a relação tabaco Vs cancro do pulmão, e apenas comparável à

1. Introdução

relação hepatite B crónica Vs cancro hepatocelular (Franco, E. L. *et al.*, 2001; Wolf, J. K. *et al.*, 2003; Lin, K. *et al.*, 2010).

Graças ao desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, mais de 90% das infecções por HPV regredem espontaneamente ao fim de 1-2 anos, e a maior parte das mulheres infectadas com HPV não chega a desenvolver neoplasia. Em indivíduos imunocompetentes, a *eliminação* da infecção é desencadeada pela imunidade celular do hospedeiro, mediada por células dirigidas às proteínas virais E2 e E6. É a acção combinada de linfócitos T, células *natural killer* e, posteriormente, a activação da imunidade humoral, que permitirá a eliminação da infecção. Os anticorpos neutralizantes sintetizados são maioritariamente dirigidos à proteína L1 da cápside viral, permitindo a remissão da infecção e manutenção de memória imunológica (Roden, R. and Wu, T.-C., 2006; Stanley, M., 2006; Stanley, M., 2010). Em indivíduos imunocompetentes a infecção é, por isso, frequentemente transitória, auto-limitada e subclínica (Lie, A. K. and Kristensen, G., 2008; Lin, K. *et al.*, 2010). A capacidade de eliminação da infecção depende, também, da predisposição genética, funcionalidade do sistema imunitário e frequência de reinfecção, co-infecção com um ou mais genótipos de HPV, período de exposição viral, genótipo infeccioso e níveis hormonais (Burd, E. M., 2003).

Em apenas 10-20% dos casos a mulher não tem capacidade de *eliminação* da infecção (Doorbar, J., 2006; Stanley, M., 2010). Se esta não é totalmente eliminada, mas a carga viral apenas suprimida para valores inferiores à sensibilidade clínica, o genoma viral é mantido latente num pequeno conjunto de células que asseguram a sua replicação (Schwartz, S. M. *et al.*, 2001; Doorbar, J., 2006). Este período de latência viral, que antecede a persistência da infecção e consequente transformação maligna, deriva de eficazes mecanismos de evasão imunitária sob os quais decorre o ciclo de vida viral, dependente do processo de maturação e diferenciação da célula hospedeira.

A posterior progressão de tecido cervical normal a neoplasia invasiva caracteriza-se pela progressão por vários graus de displasia. Esta é uma alteração celular potencialmente reversível, caracterizada por um aumento na taxa mitótica, atipia celular, alterações na diferenciação e polaridade da célula. O grau displásico é variável desde lesões de baixo grau, caracterizadas por um envolvimento mínimo das células epiteliais, a lesões de alto grau, nas quais há envolvimento epitelial crescente e maior número de células exibindo atipia, alteração da proliferação e perda da diferenciação celular (Potischman, N., 1993).

Assim, o início da infecção caracteriza-se pela formação de lesões cervicais de baixo grau, citologicamente definidas de acordo com a classificação de Bethesda como *low-grade squamous intraepithelial lesion* (LSIL), ou patologicamente designadas CIN I. A

1. Introdução

identificação de lesões cervicais avançadas, *high-grade squamous intraepithelial lesion* (HSIL), patologicamente designadas CINII-III, ou cancro cervical invasivo reflectem alterações moleculares no programa normal de diferenciação celular após a infecção, num processo evolutivo que se estima durar 15-20 anos (ASCC; Doorbar, J., 2006). A transição de CINIII a cancro cervical invasivo deve-se à persistência da infecção e corresponde à migração do DNA viral em direcção à superfície epitelial, à medida que um número crescente de células displásicas se dispõe ao longo do epitélio (Figura 8) (Stanley, M. A. *et al.*, 2007). Se a displasia for detectada precocemente, esta pode ser efectivamente tratada, evitando-se a progressão cancerígena (Doorbar, J., 2006).

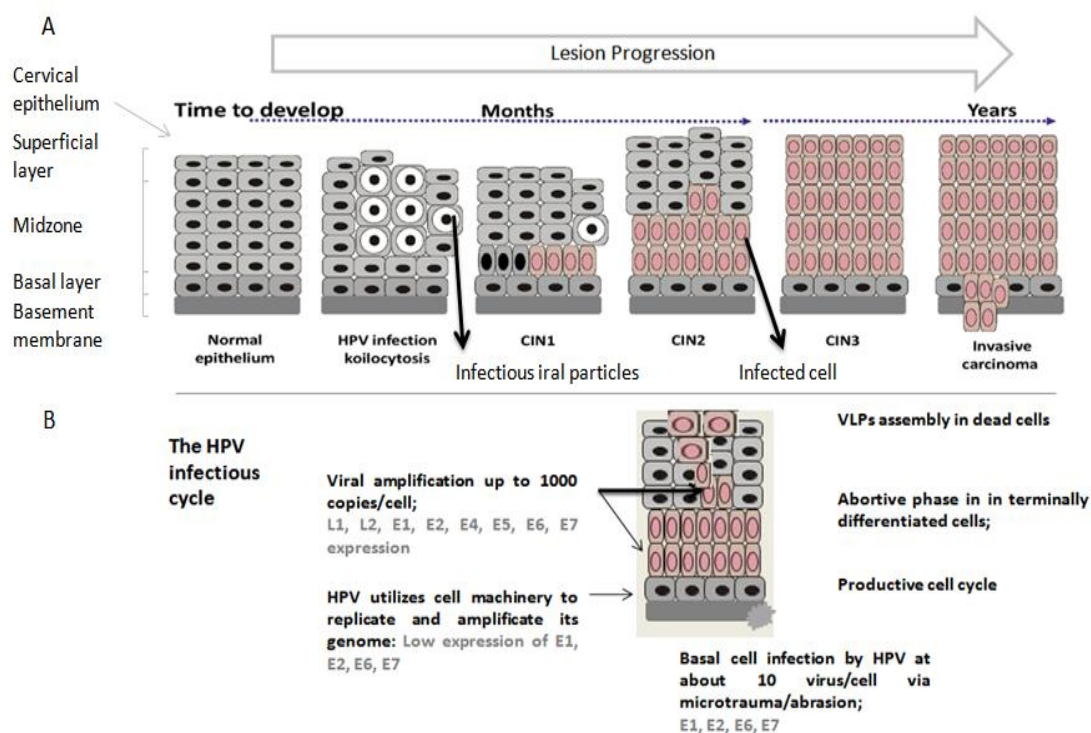


Figura 8 – Ilustração de um corte do epitélio cervical após infecção por HPV. (A) Progressão de lesões CINI-CINIII relativamente à invasão epitelial por HPV e (B) caracterização do ciclo de vida viral; Adaptado de (Stanley, M., 2006); <http://shjwomenhealthspecialist.blogspot.com/>

Assim, CINI corresponde à fase mais precoce de alterações cervicais ou displasia ligeira. 25% dos casos são causados por LR-HPV (Doorbar, J., 2006). Estas lesões exibem alterações ligeiras na estrutura celular e desarranjo na arquitectura do epitélio cervical, embora preservando a estrutura da camada basal. Com elevada taxa de regressão (50%-60%) graças à *eliminação* viral e regressão das anomalias citológicas em indivíduos imunocompetentes, apenas 30% das lesões CINI persistem e 20% progridem a CINIII (Kumar, V. *et al.*, 2007). Esta displasia ligeira é, assim, causada pela proliferação anormal das células infectadas confinadas ao terço inferior do epitélio, onde a expressão

de E6 e E7 é baixa e o genoma viral é replicado sob a forma de epissoma (Doorbar, J., 2006). Nas lesões CIN I são, ainda, visíveis alterações citopáticas mediadas pela cooperação das proteínas virais E5 e E6 de HPV, algumas das quais alterações genómicas e morfológicas típicas da infecção e utilizadas na sua identificação citológica (Krawczyk, E. *et al.*, 2008; Bharti, A. C. *et al.*, 2009).

Caso esta lesão não seja detectada e tratada precocemente, a sua evolução a CIN II e CIN III caracteriza-se pelo aparecimento de lesões de alto grau heterogêneas e geneticamente instáveis, o que facilita o desenvolvimento de novas mutações. Estas apresentam replicação viral menos activa, mas maior expressão das oncoproteínas E6 e E7 relativamente à displasia ligeira (Bharti, A. C. *et al.*, 2009). Na displasia moderada, CIN II, as células displásicas estão confinadas ao terço médio do epitélio, enquanto na displasia severa as células infectadas se estendem para o terço superior do epitélio e ocupam toda a espessura deste. Estas lesões surgem 4-5 anos após a infecção inicial, período no qual se acumulam anomalias celulares pré-neoplásicas devidas à acumulação de mutações não reparadas. Apesar da grande variação entre estudos, a taxa de regressão de CIN III foi estimada em 33% (Kumar, V. *et al.*, 2007). O estadio mais grave de displasia inclui carcinoma *in situ*, um tipo de carcinoma não invasor da membrana basal e de difícil distinção relativamente a CIN III. Apesar de poder permanecer latente por 10-20 anos, carcinoma *in situ* apresenta geralmente um padrão neoplásico susceptível de progredir a carcinoma invasivo, pois estas lesões têm baixa taxa de regressão espontânea (Potischman, N. *et al.*, 1991; Fauci, A. S. *et al.*, 2008). As diferentes propriedades morfológicas e histopatológicas das lesões displásicas e carcinoma *in situ* ilustram-se na Figura 9.

1. Introdução

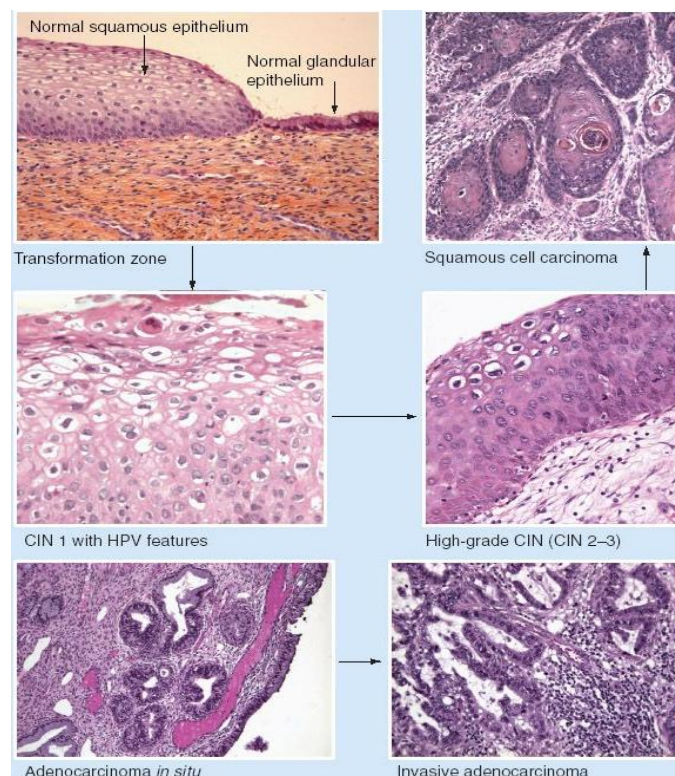


Figura 9 - Cortes histológicos do epitélio cervical representando diferentes etapas da evolução displásica a neoplasia (Lie, A. K. and Kristensen, G., 2008).

Além de uma classificação histopatológica, a doença é, ainda, classificada clinicamente de acordo com o sistema de estadiamento FIGO (*Fédération Internationale De Gynécologie Et D'obstétrique*), segundo o qual as lesões cervicais são divididas em 5 estadios (0-IV) e respectivos sub-estadios, representados pelas letras A e B e respectiva numeração I e II, consoante a extensão do tumor, grau de invasão dos nódulos linfáticos, parede pélvica e órgãos vizinhos ou à distância (Figura 10). O estadiamento é um dos factores de prognóstico mais importantes na selecção da fórmula terapêutica, redução da morbilidade e previsão da sobrevivência, pois tumores mais volumosos, de estadio avançado e/ou com padrão de invasão dos nódulos linfáticos apresentam pior prognóstico (Cooke, S. L. et al., 2011).

1. Introdução

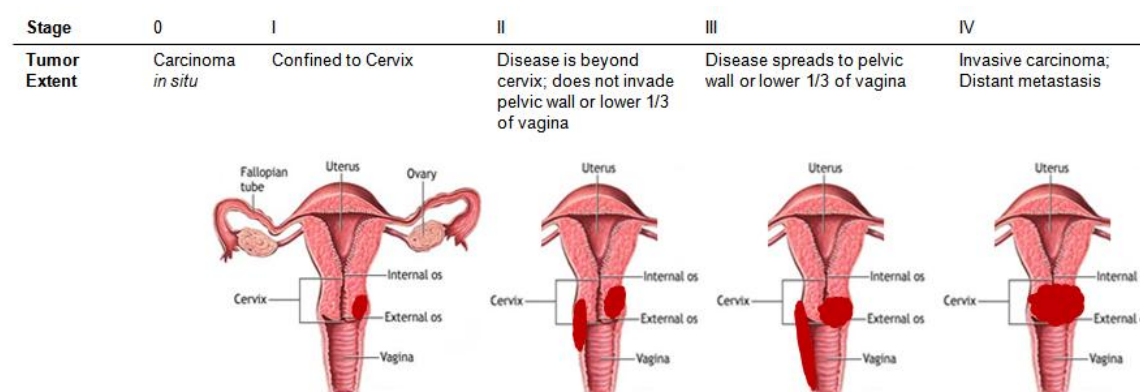


Figura 10 – Representação esquemática do estadiamento tumoral do carcinoma do colo uterino, considerando a localização e extensão tumoral; Adaptado de (Fauci, A. S. *et al.*, 2008).

Fortemente determinada pelo estadio tumoral, a taxa de sobrevivência a 5 anos de mulheres com neoplasia do colo uterino é, além de determinada pelo estadio tumoral, modulada pelo tipo e histologia tumorais, *performance status*, intervalo livre de progressão e local de recidiva (Cooke, S. L. *et al.*, 2011). Por serem críticos determinantes da resposta ao tratamento, estes factores são fortes condicionantes da sobrevivência de mulheres com neoplasia do colo uterino. Por fim, a idade é um importante factor de prognóstico, pois mulheres mais jovens apresentam, frequentemente, pior resposta à quimioterapia com platinos, colocando-se a hipótese que estas apresentem tumores mais agressivos, resistentes à terapêutica (Brader, K. R. *et al.*, 1998). Por fim, a importância do genótipo de HPV como factor de prognóstico no carcinoma invasivo do colo é controversa. Apesar de alguns estudos associarem os tumores HPV-18 a pior prognóstico, outros afirmam que o genótipo viral não se relaciona com este (Schwartz, S. M. *et al.*, 2001).

1.4.5 Tratamento do Cancro do Colo Uterino

O tratamento primário do carcinoma do colo do útero em estadios iniciais (estadios FIGO IA-IIA, $\leq 4\text{cm}$) é feito pela cirurgia isoladamente, ou pela respectiva combinação com radioterapia externa e/ou braquiterapia (Ginecologia, S. P., 2007). Ambas são igualmente efectivas no tratamento da doença inicial, localizada e pouco volumosa. Já no tratamento da doença sistémica, a radioterapia tem uma capacidade curativa limitada pelo tamanho tumoral, pois as doses necessárias ao tratamento de tumores maiores não podem ser aplicadas devido ao limite de toxicidade dos tecidos

normais. A radioterapia é, por isso, um tratamento preferencialmente local (Rose, P. G. *et al.*, 1999).

Embora não exista ainda consenso quanto à melhor abordagem terapêutica para estadios intermediários (IB2 e IIA,>4 cm), aquela que mais consenso tem reunido é a quimioradioterapia (Ginecologia, S. P., 2007). Porque múltiplos ensaios clínicos randomizados demonstraram um aumento nas taxas de sobrevivência global e livre de progressão após aplicação de quimioradioterapia na doença localmente avançada, esta tornou-se o modelo de tratamento convencionalmente aplicado nesta fase (Ginecologia, S. P., 2007; Cooke, S. L. *et al.*, 2011). A quimioterapia não só aumenta a dose-intensidade de radiação que pode ser administrada na pelve, como também contribui para o aumento da sobrevivência global e livre de progressão destas pacientes (Rose, P. G. *et al.*, 1999; Ho, J. W., 2006; Tewari, K. S. and Monk, B. J., 2010). Este efeito sinérgico deve ser atribuído à acção da cisplatina, que evita a reparação do dano sub-letal do DNA desencadeado pela radioterapia, induz a proliferação de células não proliferantes e reduz a fracção de células hipóxicas resistentes à radioterapia (Kundu, S. *et al.*, 2008). Este sinergismo deve-se, ainda, à sensibilidade celular à radiação conferida pelos platinos e à respectiva citotoxicidade directa sobre o tumor, relacionada com o nível e persistência dos respectivos aductos de DNA (Ding, Z. *et al.*, 2000; Siddik, Z. H., 2003). É a acção da platina que reduz o volume tumoral, permitindo a respectiva reoxigenação do tumor e a entrada das células em fase S, etapa do ciclo celular particularmente radiosensível. Devido à acção combinada da quimioterapia e radioterapia, este regime combinado permite a obtenção de elevadas taxas de resposta ao tratamento (66.6%-90%) (Rose, P. G. *et al.*, 1999; Chung, H. H. *et al.*, 2006).

Embora a quimioterapia e radioterapia exerçam uma acção anti-tumoral por indução da morte celular, o seu mecanismo de acção difere na forma como esta é activada. A radioterapia induz a formação e acumulação de espécies reactivas de oxigénio, modificação de bases e indução de ligações cruzadas DNA-DNA ou DNA-proteína o que, consequentemente, conduz ao aparecimento de quebras de cadeia de DNA (Farkasova, T. *et al.*, 2008). Pelo contrário, as drogas anti-neoplásicas actuam preferencialmente pela indução de dano genotóxico, eliminando as células tumorais por morte mitótica ou morte celular directa (Ding, Z. *et al.*, 2000). Enquanto algumas drogas anti-neoplásicas promovem a interrupção irreversível do crescimento pela indução de dano irreparável nos cromossomas, o que previne a divisão celular e a proliferação tumoral, outras, como os platinos, activam a morte celular por necrose ou apoptose. O seu índice terapêutico é definido como o rácio de eliminação das células tumorais Vs dano causado aos tecidos normais (Ding, Z. *et al.*, 2000).

No caso particular da cisplatina, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], porque esta não possui grupos alquil nem induz reacções alquilantes, é considerada uma droga semelhante, mas não um agente alquilante puro. Desde 1964, quando as suas propriedades anti-tumorais foram identificadas por Barnett Rosenberg, a cisplatina tem tido grande impacto no controlo de múltiplos tumores sólidos, nomeadamente, neoplasia da cabeça e pescoço, neoplasia do ovário, neoplasia dos testículos e neoplasia da bexiga (Siddik, Z. H., 2003; Kostova, I., 2006). Esta é, também, o composto derivado da platina mais utilizado no tratamento do carcinoma cervical (Kostova, I., 2006). A cisplatina é um derivado da platina de primeira geração, cujo principal alvo de acção é o DNA. A citotoxicidade da droga deve-se, em grande parte, à alquilação de grupos nucleares (fosfato, amino, hidroxilo, carboxilo, entre outros) e consequente formação de aductos de DNA-proteína e ligações cruzadas inter e intra-cadeia de DNA. Porque são as ligações intra-cadeia as principais responsáveis pelo efeito citotóxico da droga, uma correlação linear entre o volume de cisplatina associado ao DNA e a extensão da respectiva citotoxicidade foi descrita (Siddik, Z. H., 2003; Kostova, I., 2006). Esta associa-se, consequentemente, à inibição da síntese de DNA, supressão da transcrição de RNA e desregulação do ciclo celular. O dano no DNA não deve ser reparado para que a morte celular seja activa (Siddik, Z. H., 2003; Yu, J. J., 2009). Contudo, a perda de selectividade nalguns tumores associa-se ao aparecimento de efeitos colaterais severos, como ototoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, potencialmente reversíveis após interrupção do tratamento. Nestes casos, a cisplatina pode ser substituída por carboplatina, análogo de segunda geração, associada a efeitos adversos menos frequentes (Kostova, I., 2006).

Por outro lado, verificou-se que as taxas de resposta à quimioterapia com compostos de platina são muito variáveis para a mesma droga. Esta grande variação é possivelmente devida ao *performance status* do paciente, respectivos factores genéticos, nomeadamente polimorfismos em genes codificantes de enzimas envolvidas no transporte e metabolismo da droga, síntese e reparação do DNA ou cascata da apoptose, intervalo e local de recorrência da doença (Brader, K. R. *et al.*, 1998). Adicionalmente, e apesar de a cisplatina inicialmente reduzir o tamanho tumoral, verifica-se, frequentemente, o aparecimento de clones tumorais resistentes. O facto de tumores resistentes à quimioterapia apresentarem, muitas vezes, resistência simultânea à radioterapia torna-os tumores de pior prognóstico e acentua a necessidade de seleccionar adequadamente as pacientes submetidas a regimes de quimioterapia com platinos (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009).

A resistência tumoral às drogas anti-neoplásicas é um fenómeno multifactorial frequente, clinicamente definido como progressão da doença em pacientes tratados com

quimioterapia sem toxicidade mensurável (Yu, J. J., 2009). Para a combater, regimes combinados de drogas anti-neoplásicas são frequentemente utilizados, substituindo um modelo primário formado por apenas um composto. Regimes combinados de cisplatina com 5-fluoracil (5-FU), paclitaxel, irinotecano, topotecano ou ifosfamida podem ser utilizados para aumentar a sua eficiência terapêutica e/ou ultrapassar a irresssecabilidade de tumores avançados (Ginecologia, S. P., 2007; Fauci, A. S. *et al.*, 2008; Tewari, K. S. and Monk, B. J., 2010). Da mesma forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de novos modelos terapêuticos, designadamente quimioterapia neoadjuvante. Embora não seja ainda aplicada em Portugal neste modelo tumoral, ensaios clínicos e literatura demonstram resultados favoráveis à sua aplicação baseada em cisplatina (Chung, H. H. *et al.*, 2006; Cheng, X.-D. *et al.*, 2009).

Para que seja possível desenvolver novas metodologias terapêuticas que ultrapassem a resistência tumoral ao tratamento primário, torna-se necessário compreender alguns dos mecanismos-base do seu desenvolvimento. Sabe-se que é a duração e intensidade relativa dos sinais pró-apoptóticos e pró-sobrevivência integrados após a exposição à cisplatina que determinam o destino celular após o tratamento, determinando se a célula sofre apoptose ou segue uma via de sobrevivência celular e resistência (Siddik, Z. H., 2003). O fenótipo resistente resulta de uma resposta adaptativa das células tumorais que, através de múltiplas vias, interagem para contrariar o efeito dos agentes citotóxicos (Mellor, H. R. and Callaghan, R., 2008). Este fenómeno tanto pode ser primário - intrinsecamente associado às células tumorais, como secundário, se adquirido após a exposição crónica das células tumorais à droga. Variável consoante a linhagem celular, a resistência às drogas é um mecanismo regulado por factores do hospedeiro e outras alterações genética e epigeneticamente reguladas (Siddik, Z. H., 2003; Mellor, H. R. and Callaghan, R., 2008).

Visto que algumas destas alterações são visíveis na displasia cervical, e parte se associa à progressão tumoral e quimioradioresistência, coloca-se a hipótese que alterações subjacentes a estes processos ocorram precocemente no processo de carcinogénese (Siddik, Z. H., 2003; Lando, M. *et al.*, 2009). A prevalência destas alterações reflecte a instabilidade genética e fenotípica das células tumorais submetidas à pressão selectiva e mutagénica dos agentes anti-neoplásicos (Ding, Z. *et al.*, 2000). A identificação de subpopulações tumorais com diferentes níveis de resistência intrínseca à quimioradioterapia nalguns tumores cervicais avançados e o pobre *outcome* destas pacientes suportam o papel da heterogeneidade intra-tumoral na neoplasia cervical (Cooke, S. L. *et al.*, 2011). Sabe-se, adicionalmente, que cada tumor pode apresentar mais do que um mecanismo de resistência, o que ajuda a explicar o motivo pelo qual a

resistência anti-neoplásica é geralmente um fenómeno cruzado entre diferentes compostos (Siddik, Z. H., 2003; Ho, J. W., 2006).

Tem sido ainda verificado que a resistência à terapêutica no carcinoma cervical não depende apenas de factores do hospedeiro, mas também da expressão génica viral. Estudos *in vitro* nas linhagens celulares de carcinoma cervical C33A (HPV-) e SiHa (HPV+) demonstraram que a exposição à radiação pode aumentar de forma significativa e duradoura a expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* de HPV-16, os quais, por sua vez, aumentam a resistência das células imortalizadas à quimioradioterapia e lhes conferem vantagem selectiva de crescimento (Santin, A. D. *et al.*, 1998; Aungsumart, S. *et al.*, 2007). Verificou-se, ainda, que a proteína *E7* de HPV-16 pode ser um importante factor de agressividade em tumores avançados devido, essencialmente, ao fenótipo de multiresistência conferido às células infectadas (Aungsumart, S. *et al.*, 2007). Também a inactivação de *p53* pela oncoproteína *E6* se deve associar à resistência ao tratamento, potencialmente ultrapassada pela utilização de modelos de terapêutica combinada (Saxena, A. *et al.*, 2005).

A nível molecular, devem ser moléculas de bloqueio, redução da concentração da cisplatina livre no citoplasma e/ou aumento da respectiva detoxificação a estar envolvidas nos mecanismos de resistência aos derivados da platina. Particularmente no caso da cisplatina, considera-se que a redução do influxo da droga para concentrações não citotóxicas seja o principal mecanismo redutor da sua concentração intra-celular. A tolerância celular à presença de aductos no DNA pode ser devida a alterações na função da proteína *p53* na resposta à citotoxicidade da cisplatina e dano induzido pela radiação (Koivusalo, R. *et al.*, 2002). Por outro lado, a sobre-expressão de proteínas da via *nucleotide excision repair* (NER) ou *mismatch repair* (MMR) pode ser também essencial à reparação dos aductos e tolerância ao dano (Figura 11) (Siddik, Z. H., 2003; Kostova, I., 2006; Mellor, H. R. and Callaghan, R., 2008; Yu, J. J., 2009). Assim, são alterações nas vias de reconhecimento e reparação do dano no DNA, activação da apoptose e variação na respectiva concentração intra-celular que devem modular a concentração de cisplatina e, conseqüentemente, a sua citotoxicidade. O aparecimento de mecanismos de multi-resistência às drogas aumenta a probabilidade de aparecimento de neoplasias secundárias em pacientes tratados com estes compostos (Ding, Z. *et al.*, 2000).

1. Introdução

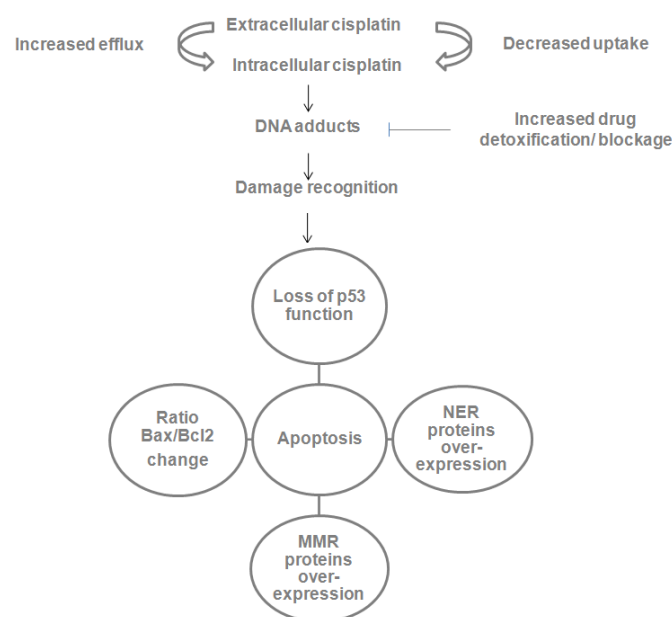


Figura 11 – Alguns mecanismos de resistência à cisplatina; Adaptado de (Siddik, Z. H., 2003).

1.5 Estudo dos Polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T

A farmacogenómica procura conhecer as bases genéticas determinantes das diferenças inter-individuais que estão na base da variação na resposta ao tratamento da doença. Esta informação deve ser aplicada clinicamente para, por um lado, personalizar a medicina em função das necessidades e características do paciente, e por outro, reduzir a toxicidade e aumentar a taxa de resposta ao tratamento (Le, W. *et al.*, 2005). Sabe-se que as interações ambientais com os factores genéticos desempenham aqui um papel determinante, sendo os polimorfismos genéticos elementos modificadores desta relação.

Para a selecção de ambos os polimorfismos abordados neste trabalho consideraram-se genes cujos produtos estão envolvidos em processos vitais, designadamente a reparação do DNA e o metabolismo do folato. Para a pesquisa de polimorfismos funcionais, potencialmente relacionados com a carcinogénese, recorreu-se a fontes de informação genética e biomédica.

Múltiplos estudos têm sugerido a existência de grande variação inter-individual na reparação do DNA, a qual tem um papel fundamental na carcinogénese e modulação da função dos platinos. A sua regulação pode ter implicações clínicas importantes, evidenciadas pelo facto de a sua redução se associar, por um lado, ao aumento das taxas de sobrevivência de pacientes com cancro tratados com quimioterapia baseada em

platinos, e por outro, ao maior risco de recidiva (Chung, H. H. *et al.*, 2006). Estudou-se o gene *X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1)* pois este é um gene funcional e altamente polimórfico, cujos SNPs podem afectar a capacidade celular de resposta ao dano após exposição a agentes alquilantes ou radiação. O polimorfismo estudado é o SNP de *XRCC1* com maior prevalência na população, o que contribuiu para a sua selecção.

Gamma Glutamyl Hydrolase (GGH) é um gene funcional polimórfico, codificante de uma enzima reguladora da concentração do folato intra-celular. Como o polimorfismo *GGH -401C>T* altera a expressão da enzima GGH e, consequentemente, a concentração do folato intra-celular, estudos epidemiológicos têm analisado a potencial relação entre este SNP, a concentração de folato e a progressão da neoplasia epitelial, nomeadamente do colo uterino. Por isso, pretendeu-se verificar se este SNP influencia a progressão neoplásica na amostra analisada e se o seu comportamento afecta a resposta à quimioradioterapia com cisplatina.

1.5.1 Reparação do DNA – *Via Base Excision Repair*

Os genes envolvidos na reparação do DNA codificam enzimas responsáveis pela monitorização e reparação da lesão, assegurando a protecção do DNA face ao dano genómico (Farkasova, T. *et al.*, 2008). Estas enzimas integram uma de quatro vias de reparação, designadamente BER, NER, MMR ou *double-strand break repair* consoante a respectiva função e lesão reconhecida (Wood, R. D. *et al.*, 2001; Goode, E. L. *et al.*, 2002).

A via BER, da qual faz parte a proteína XRCC1, é o principal mecanismo de reparação do dano de origem endógena, criado pela acção de espécies reactivas de oxigénio, compostos metabólicos, metilação, hidroxilação e desaminação espontânea de bases de DNA, ou exógena, formado a partir da exposição à radiação ou agentes alquilantes e metilantes indutores de quebras de cadeia de DNA (Caldecott, K. W., 2003; Hu, Z. *et al.*, 2005; Ladiges, W. C., 2006). Consoante o tipo e origem da lesão, estadio do ciclo celular e diferenciação da célula, é selectivamente activa uma de duas sub-vias de reparação, designadas *short-patch* BER e *long-patch* BER. Na primeira, apenas um nucleótido é reparado e inserido na cadeia de DNA, enquanto na via *long-patch* BER 2-15 novos nucleótidos são inseridos na cadeia de DNA (Caldecott, K. W., 2003).

Cinco etapas do processo de reparação e algumas das respectivas enzimas são partilhadas entre ambas as vias (Caldecott, K. W., 2003). Assim, a remoção da base

danificada, abertura da dupla hélice para subsequente síntese de DNA, a síntese de novos nucleótidos para preencher o espaço formado pela excisão de uma base e a etapa final de elongação da cadeia de DNA são etapas comuns a ambas as vias de reparação (Caldecott, K. W., 2003; Chou, W.-C. *et al.*, 2008). Esta sequência ordenada de eventos inicia-se pelo reconhecimento e remoção de uma base por uma glicosilase. Se activada uma glicosilase bifuncional, esta catalisa a clivagem do resíduo abásico e forma um espaço de um nucleótido na cadeia de DNA. É, subsequentemente, activa a enzima apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) que substitui a glicosilase no local de ligação ao DNA e recruta a polimerase β (POL β) para o local da lesão, onde forma um complexo de reparação com a enzima XRCC1. POL β preenche o espaço resultante da excisão da base danificada e a incisão resultante é selada pelo complexo XRCC1-Ligase III α (LIGIII α), que assegura o final da via *short-patch* BER (Chou, W.-C. *et al.*, 2008). Por outro lado, as glicosilases da via *long-patch* BER são monofuncionais. Removem uma base reduzida e criam um local abásico que não têm capacidade de reparar. Como esta via de reparação envolve a excisão de um local abásico reduzido, é necessária síntese adicional de DNA e substituição da cadeia, formando-se uma aba nucleotídica constituída pelo próprio local abásico e pelos 2-15 nucleótidos acrescentados em excesso pelo complexo proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-POL β . Esta é, subsequentemente, removida pela enzima flap endonuclease 1 (FEN1). POL β / δ / ϵ assegura a síntese final da cadeia de DNA e ligase I (LIGI) a restauração da integridade da molécula original (Figura 12) (Caldecott, K. W., 2003; Chou, W.-C. *et al.*, 2008).

Porque XRCC1 interage com todos os componentes que actuam sobre o DNA após a glicosilase, esta tem uma acção central na coordenação da actividade das outras proteínas da via BER (Beernink, P. T. *et al.*, 2005; Horton, Julie K., *et al.*, 2008).

1. Introdução

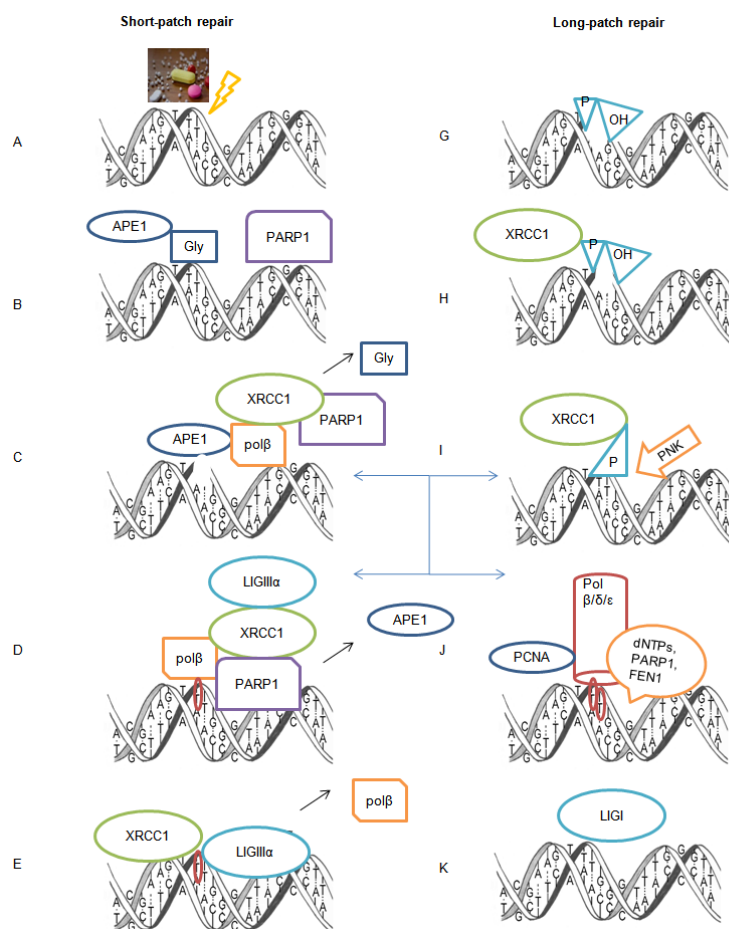


Figura 12- Representação esquemática das sub-vias *short-patch* BER (A-E) e *long-patch* BER (Fan, J. *et al.*). A via *short-patch* BER, activa pelo reconhecimento de dano numa base no DNA, caracteriza-se pela acção do complexo XRCC1-Polymerase β (POL β) na reparação da lesão e inserção de um nucleótido na cadeia de DNA danificada (D). A via *long-patch* BER é activa na remoção de nucleótidos reduzidos (H). O local abásico resultante é corrigido pela adição de 2-15 nucleótidos (J), cujo excesso é removido pela enzima flap-endonuclease 1 (FEN1); Adaptado de (Caldecott, K. W., 2003; Fan, J. *et al.*, 2004; Rao, K. S., 2007).

1.5.2 O Gene *XRCC1* e o Polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln

O papel de XRCC1 na reparação do DNA foi inicialmente identificado ao estudar as linhagens celulares *chinese hamster ovary cells* (CHO), cuja expressão de XRCC1 é baixa (Ladiges, W. C., 2006). Fenotipicamente descritas como hipersensíveis a agentes metilantes e alquilantes, estas apresentam, ainda, sensibilidade moderada a espécies reactivas de oxigénio e fraca sensibilidade à radiação. A elevada frequência de trocas de cromátídeos irmãos e quebras de cadeia simples de DNA são revertidas pela transfecção de *XRCC1*, o que torna estas células um modelo das consequências da perda ou

redução da actividade do gene. EM9, EM-C11 e EM-C12 são as linhagens celulares CHO mais estudadas (Duell, E. J. W. *et al.*, 2000; Caldecott, K. W., 2003).

O gene *XRCC1* localiza-se no cromossoma 19q13.2-3 e é formado por 17 exões e 2102 bp, ocupando uma região genómica de 32Kb (Van Gils, C. H. *et al.*, 2002; Ladiges, W. C., 2006). Porque a sua inactivação é letal em embrião de morganho e ratos apresentando reduzida concentração da proteína *XRCC1* manifestam hipersensibilidade aos agentes de dano no DNA e instabilidade genómica, este é considerado um gene vital ao desenvolvimento, cujas variações devem estar sujeitas a pressão selectiva negativa (Shen, M. R. *et al.*, 1998; Ladiges, W. C., 2006; Saadat, M. *et al.*, 2009). Codifica uma proteína multimérica formada por 633 aminoácidos, a *XRCC1*. Esta tem uma localização nuclear e é constituída por três principais domínios globulares, designadamente *nuclear terminal domain* (NTD) e dois *BRCA1 susceptibility protein C-terminal domain* (BRCT1, BRCT2), além de um sinal de localização nuclear e um local sensível à fosforilação pela enzima regulatória casein kinase 2 (Ck2) (Figura 13).

NTD é o local de ligação ao DNA fragmentado, POL β (Beernink, P. T. *et al.*, 2005; Farkasova, T. *et al.*, 2008) e à oncoproteína E6 de HPV. Como esta região de ligação a E6 se sobrepõe parcialmente ao domínio de ligação a POL β , esta interacção pode impedir a formação do complexo de reparação do DNA *XRCC1*-POL β e, consequentemente, reduzir a efectividade da via BER (Farkasova, T. *et al.*, 2008).

BRCT1 localiza-se na região central de *XRCC1* e regula a sua interacção com as proteínas PARP1 e PARP2 (Farkasova, T. *et al.*, 2008). Responsável pela regulação da actividade de *XRCC1* durante a via *single-strand break repair* (SSBR) nas fases G₁ e S/G₂ do ciclo celular, BRCT1 associa-se e regula a expressão da proteína PARP1. Por outro lado, BRCT2 localiza-se na região C-terminal de *XRCC1*, a partir da qual regula a sua interacção com a proteína LIGIII α e a acção de *XRCC1* na via SSBR, especialmente nas fases G₀ e G₁ do ciclo celular (Huang, Y. *et al.*, 2009). Entre os domínios BRCT encontra-se o local de ligação à enzima Ck2 (Chou, W.-C. *et al.*, 2008).

Sabe-se que as células apresentando variações no gene *XRCC1* demonstram maior sensibilidade à radiação ionizante e ultra-violeta, agentes oxidantes, metilantes e alquilantes. Pensa-se que esta seja devida ao papel crítico que *XRCC1* desempenha nas vias BER e SSBR (Hu, J. J. *et al.*, 2001). O facto de *XRCC1* actuar, simultaneamente, como proteína de suporte e regulação da via BER faz com que a sua acção seja, por um lado, modulada por enzimas-chave com as quais interage durante a reparação do DNA e, por outro, com que seja ela a regular a sequência e taxa de actividade das outras enzimas da mesma via de reparação (Marsin, S. *et al.*, 2003). Deste modo, *XRCC1*

1. Introdução

recruta para o local enzimas activas na reparação do DNA, participa na remoção e reparação de pequenos aductos de cadeia simples, aductos não volumosos resultantes da acção de agentes alquilantes e metilantes e reparação do dano oxidativo pelas vias BER e SSBR (Metsola, K. *et al.*, 2005; Cheng, X.-D. *et al.*, 2009). Participa, ainda, na reparação de outros tipos de aductos induzidos pela acção da cisplatina, nomeadamente quebras de cadeia dupla de DNA através da via *nonhomologous end-joining* (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009).

Porque este é um gene altamente polimórfico, a presença de variações genéticas próximas dos domínios proteicos essenciais à actividade de XRCC1 é susceptível de alterar a conformação proteica e/ou a sua capacidade de interacção com outras proteínas da via BER (Chou, W.-C. *et al.*, 2008; Cheng, X.-D. *et al.*, 2009). A efectividade desta e da via SSBR pode ser, consequentemente, alterada. A Figura 13 ilustra a localização dos três mais frequentes polimorfismos do gene *XRCC1*, a sua posição na proteína relativamente aos domínios de interacção proteica e, por fim, outras proteínas da via BER ou SSBR cuja interacção pode ser afectada.

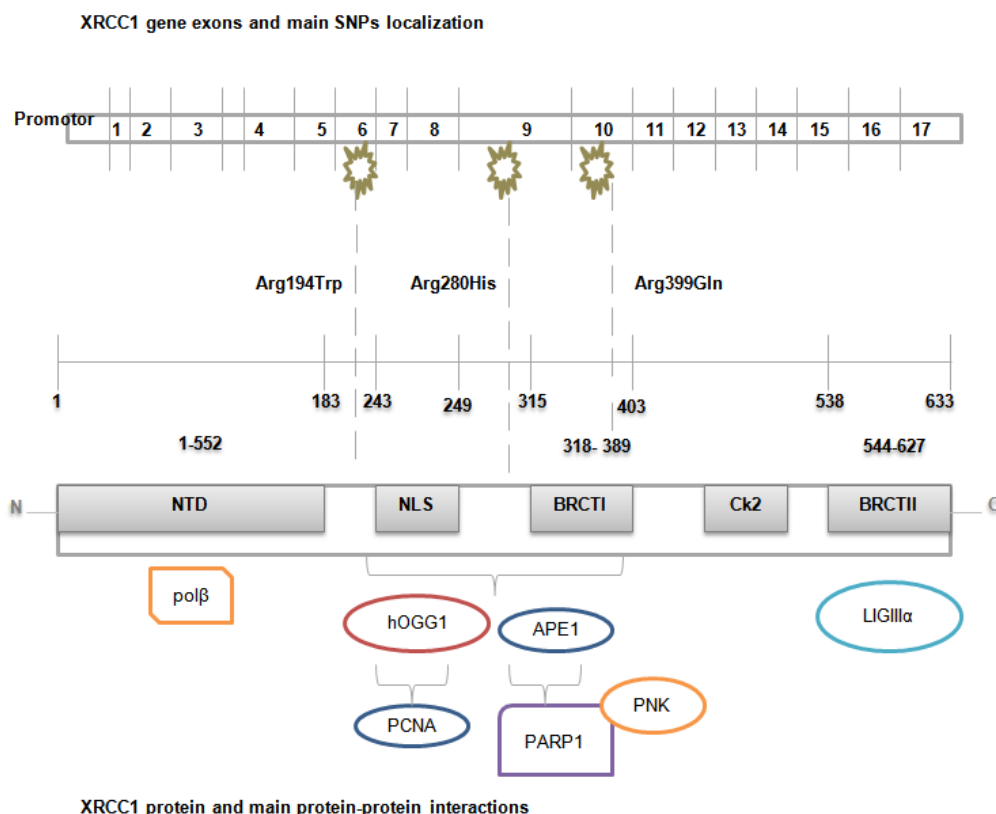


Figura 13 – Gene *XRCC1* e respectiva proteína. Em cima, representa-se a estrutura do gene *XRCC1* e os três polimorfismos mais frequentes (frequência>0.05) Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln em cada um dos respectivos exões. Em baixo, representa-se a proteína *XRCC1* e os principais domínios proteicos essenciais

1. Introdução

à reparação do DNA. Junto a cada um dos domínios, representam-se as proteínas da via BER com as quais XRCC1 interage na reparação do dano e cuja interacção pode ser modificada pela presença destes SNPs; Adaptado de (Sterpone, S. and Cozzi, R., 2010).

O polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln é, tal como os restantes SNPs referidos na Figura 13, não-sinónimo *missense*. Ocorrendo na região terminal CO₂H do domínio BRCT1, este corresponde à substituição alélica G→A no exão 10. A substituição não conservativa de aminoácidos Arginina→Glutamina no codão 399 pode induzir a formação de uma proteína retorcida com afinidade variável para as restantes proteínas com as quais interage, assim como funcionalidade incerta, o que, consequentemente, interfere com a capacidade de reparação do DNA (Hu, Z. *et al.*, 2005; Metsola, K. *et al.*, 2005).

Devido ao seu potencial papel facilitador do desenvolvimento de cancro, esta variação genética tem vindo a ser estudada em múltiplas neoplasias. Já foi, por exemplo, associada a maior risco de neoplasia do estômago, pâncreas e próstata (Farkasova, T. *et al.*, 2008).

1.5.3 Metabolismo do Folato

O folato e respectivos derivados são compostos vitais, essenciais ao metabolismo celular. O folato, uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, é um co-factor fundamental a múltiplas reacções metabólicas devido à sua capacidade de doar ou aceitar unidades de carbono (Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002).

Como o organismo não tem capacidade de síntese *de novo* de folato, este é principalmente obtido a partir dos frutos e vegetais da dieta sob a forma de folilpoli-γ-glutamatos (Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). No entanto, os poli-γ-glutamatos não atravessam a membrana celular para absorção. Estes são primeiramente sujeitos a hidrólise pela enzima glutamato carboxipeptidase II da bordadura em escova do jejuno, que os converte a folatos monoglutâmicos, dos quais 5-metil-THF é a principal forma circulante na corrente sanguínea (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). A posterior absorção para o meio intra-celular é feita ao nível dos tecidos pelo transportador de folato reduzido 1 (RFC1), principal transportador de folatos e anti-folatos para o meio intra-celular, ou pelo receptor de folato 1 (FOLR1), de acordo com o tecido-alvo (DeVos, L. *et al.*, 2008). O seu processamento adicional é intra-celular e decorre pela acção da enzima folil-poliglutamato sintetase (FPGS) que catalisa a adição sequencial de poli-γ-glutamatos ao composto absorvido, reconvertendo-o à sua forma

original de folilpoli- γ -glutamato. Por apresentarem menor afinidade para os transportadores de membrana, os poliglutamatos são mais fortemente retidos no interior das células relativamente aos monoglutamatos. Estes constituem, por isso, um melhor substrato para as enzimas dependentes do folato dihidrofolato-redutase (DHFR), timidilato sintase e outras enzimas envolvidas no metabolismo dos grupos de 1 carbono, quando comparados com os monoglutamatos (Chave, K. J. *et al.*, 2003). Catalisando a reacção inversa, a enzima GGH regula a concentração dos reservatórios de folato intra-celulares e assegura o equilíbrio do respectivo metabolismo (Figura 14) (Yin, D. *et al.*, 2003; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). Este é estritamente regulado para que o gradiente de concentração do folato entre o plasma e os tecidos se mantenha constante.

É dependente deste equilíbrio que o metabolismo dos grupos de 1 carbono se desenvolve no meio intra-celular. Após a entrada do folato na célula, este é reduzido a dihidrofolato e este, por sua vez, a tetrahydrofolato (THF) por acção da enzima DHFR. Seguidamente, é a doação de grupos metil ao composto THF que permite a formação de 5,10-metileno-THF numa das reacções críticas do metabolismo dos grupos de 1 carbono. 5,10-metileno-THF actua como co-factor da enzima timidilato-sintase, cedendo grupos metil na reacção de conversão uridilato $\rightarrow$ timidilato essencial à síntese da timina. Por fim, a enzima metilenotetrahydrofolato redutase converte, de forma irreversível, parte do 5,10-metileno-THF recém-sintetizado a 5-metil-THF, envolvido na síntese das purinas e no ciclo da homocisteína. É a transferência de um grupo metil para a homocisteína que permite a síntese ou regeneração da metionina. A sua conversão à respectiva forma activa S-adenosilmetionina faz desta o principal dador de grupos metil para a metilação do DNA, histonas e outras moléculas bioactivas (Figura 14) (Duthie, S. J., 1999; Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002).

1. Introdução

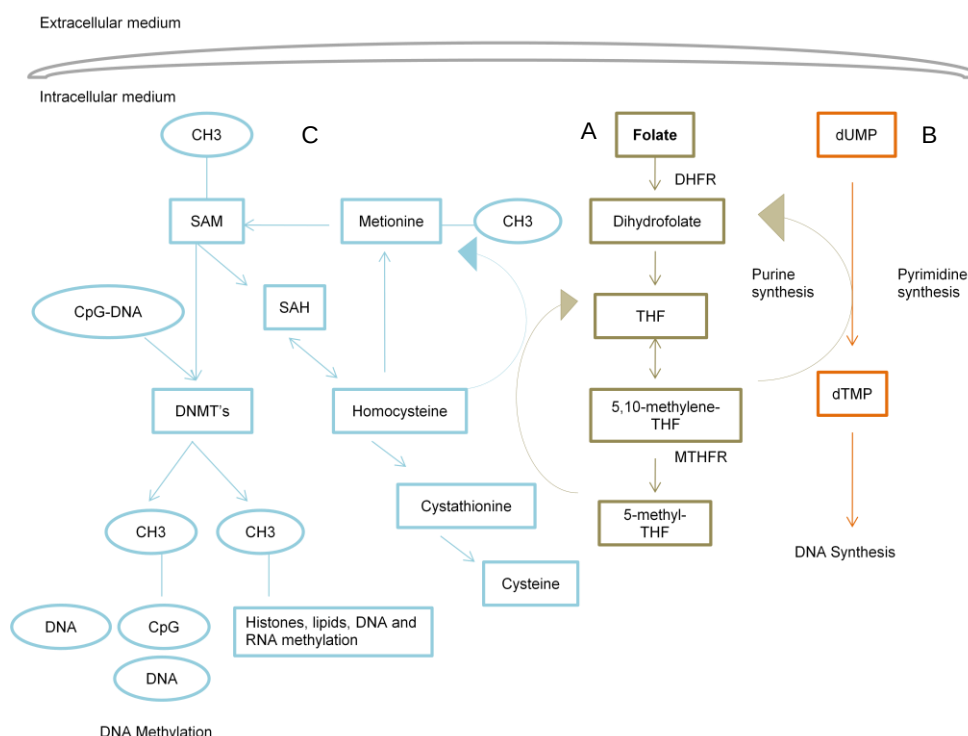


Figura 14 – Metabolismo do folato. (A) Os compostos de folato provenientes da dieta são progressivamente metabolizados até à formação das co-enzimas essenciais ao metabolismo dos grupos de 1 carbono: (B) 5,10-metileno-tetrahydrofolato (THF) é dador de unidades de 1 carbono na metilação de uridilato (dUMP) a timidilato (dTMP), reacção essencial à síntese da timina; (C) Seguidamente, parte do composto é convertido a 5-metil-THF, vital à síntese das purinas e dador de grupos metil na metilação da homocisteína a metionina. A sua forma activa, S-adenosilmetionina (SAM), actua como principal dador de grupos metil na metilação das ilhotas CpG do DNA e outras moléculas bioactivas; Adaptado de (Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002; Lamprecht, S. A. and Lipkin, M., 2003; Kawakami, K. *et al.*, 2008).

Além do importante papel que as enzimas do metabolismo do folato têm no respectivo processamento, estas actuam também sobre os anti-folatos, regulando a respectiva concentração intra-celular e efectividade da droga. Os anti-folatos, nomeadamente o metotrexato (MTX), são compostos largamente utilizados no tratamento de doenças de natureza inflamatória, como a artrite reumatóide, ou neoplásicas, como o cancro da cabeça e pescoço, cancro da mama, sarcoma osteogénico e algumas neoplasias hematológicas. Estes são compostos análogos ao folato que actuam como inibidores competitivos das enzimas dependentes deste (Cheng, Q. *et al.*, 2006; Organista-Navaa, J. *et al.*, 2010).

No caso particular do MTX, é a respectiva poliglutamilação pela enzima FPGS que reduz o efluxo da droga e prolonga o seu efeito. Verifica-se, adicionalmente, que os poliglutamatos de MTX de cadeia longa apresentam maior afinidade para a enzima DHFR

1. Introdução

e outras enzimas essenciais à síntese de purinas e pirimidinas, o que inibe a síntese *de novo* dos precursores nucleotídicos e a replicação do DNA, conduzindo, consequentemente, à morte celular (Cole, P. D. *et al.*, 2001; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006; Organista-Navaa, J. *et al.*, 2010). Os poliglutamatos de MTX de cadeia longa são, contudo, reconvertidos a compostos de cadeia curta, e estes a MTX pela acção simplificadora da GGH (Chave, K. J. *et al.*, 2003; Organista-Navaa, J. *et al.*, 2010).

A sensibilidade ao MTX e outros anti-folatos e, consequentemente, a sua eficácia anti-tumoral é, pois, determinada pela quantidade de droga livre acumulada no meio intracelular, por sua vez, determinada pelo equilíbrio entre as enzimas FPGS e GGH (Rhee, M. S. *et al.*, 1998). Porque a sobre-expressão de GGH e o aumento da sua actividade relativamente a FPGS reduzem esta concentração, estes têm vindo a ser associados a mecanismos de resistência adquirida ao MTX e outros anti-folatos em linhagens celulares de sarcoma humano e leucemia linfóide aguda (LLA), assim como mecanismos de resistência primária em leucemia mieloide aguda infantil (Cole, P. D. *et al.*, 2001; Yin, D. *et al.*, 2003). O rácio FPGS/GGH é, por isso, não apenas importante na manutenção e metabolismo do folato, mas também no aparecimento de resistência às drogas interferentes no metabolismo do folato (Rhee, M. S. *et al.*, 1998; Cole, P. D. *et al.*, 2001; Chave, K. J. *et al.*, 2003).

1.5.4 O Gene *GGH* e o Polimorfismo *GGH* -401C>T

GGH é um gene ubíquo e bem conservado. O gene humano é formado por 24 Kb e 9 exões localizado no cromossoma 8q12.23-13.1 (Yao, R. *et al.*, 1996; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). Pela análise de diferentes linhagens celulares, apenas um transcrito de mRNA *pós-splicing* foi identificado. Porque um elemento regulatório positivo essencial à actividade basal do promotor na região 5' do gene (relativamente ao local de início da transcrição, posições -52 a +4) e dois elementos inibitórios (posições -96 a -52; posições +88 a +104) foram observados em células MCF7 de cancro da mama mas não HepG2 de hepatoma, uma regulação tecido-específica da expressão génica foi sugerida (Yin, J. *et al.*, 2002; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).

A enzima codificada no Homem, também designada folil-poliglutamato hidrolase, é um homodímero proteico de 318 aminoácidos da família peptidases C26. É o conjunto de aminoácidos Cis-110, His-220, Glu-222, Tir-36 e His-171 fortemente conservado que define o centro catalítico da GGH. Porque a cisteína-110 é fundamental à actividade catalítica da enzima, esta pode ser também classificada como peptidase de cisteína.

1. Introdução

Verificou-se, adicionalmente, que os primeiros 24 aminoácidos da região N-terminal da glicoproteína actuam como péptido de sinal sobre o retículo endoplasmático, devendo ser clivados para formação de uma enzima madura (Rhee, M. S. *et al.*, 1998; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). Esta requer ainda a presença de grupos sulfidril reduzidos no meio para que tenha actividade máxima (Yin, J. *et al.*, 2002; Odin, E. *et al.*, 2003). A enzima, activa a pH óptimo 4.5-6.0, é uma enzima lisossomal, cuja localização organelar permite a separação do processo anabólico de adição de novos glutamatos, do processo catabólico de remoção destes. Esta segregação física garante a manutenção da homeostase do metabolismo do folato (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).

Verificou-se, no entanto, na linhagem celular H35 de hepatoma e outras linhagens tumorais que a maior parte da actividade enzimática é secretada para o meio. A sua secreção é importante no processo de degradação dos poliglutamatos de folato extracelulares, desta forma convertidos a formas monoglutâmicas transportáveis e acumuláveis nas células (Yao, R. *et al.*, 1996; Odin, E. *et al.*, 2003; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).

GGH actua, assim, sobre os conjugados de folato folilpoli- γ -glutamatos e anti-folilpoli- γ -glutamatos, sendo os folilpoli- γ -glutamatos o seu substrato preferencial. O respectivo mecanismo catalítico envolve o ataque nucleofílico da cisteína-110 do centro catalítico da enzima à região γ -carbonil de uma ponte Glu- γ -Glu do composto, de modo a formar um intermediário enzimático e libertar um composto amina. Como GGH pode clivar as duas ligações mais externas do composto-alvo, esta actua não apenas como exopeptidase, mas também como endopeptidase, consoante a especificidade própria do respectivo tecido. A enzima liberta sequencialmente mono-glutamato ou di-glutamato até à formação de pteroil- α -glutamato (folato) e glutamato livre, produtos finais da sua actividade (Rhee, M. S. *et al.*, 1998; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).

No que se refere ao seu padrão de actividade, grande disparidade tem vindo a ser descrita. Múltiplas modificações genéticas e epigenéticas com implicações farmacogenómicas foram identificadas em células de LLA infantil, entre elas a metilação de ilhotas CpG da região promotora de *GGH*, associada a uma alteração na expressão de mRNA e actividade catalítica da enzima (Cheng, Q. *et al.*, 2006). Adicionalmente, grande variação inter-individual pode dever-se a variações cariotípicas, nomeadamente trissomia do cromossoma 8, ou à presença de polimorfismos na região codificante ou promotora do gene, designadamente *GGH* +452C>T ou *GGH* -401C>T (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). Em células de LLA hiperdiplóide-B e linhagem T, o SNP *GGH* +452C>T (Thr127Ile) reduziu a expressão de mRNA de *GGH*, o que diminuiu a actividade

1. Introdução

hidrolítica da enzima sobre poliglutamatos de MTX de cadeia longa e prolongou a respectiva acção (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006; Organista-Navaa, J. *et al.*, 2010). Por outro lado, em cancro colo-rectal (CCR) e LLA, a redução da actividade enzimática e/ou o silenciamento génico associados à redução da expressão do mRNA de *GGH* foram atribuídos à metilação de ilhotas CpG do promotor (Cheng, Q. *et al.*, 2006; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).

Quanto ao SNP *GGH* -401C>T, este corresponde à troca de um nucleótido citosina por timina na região promotora do gene, o que aumenta a actividade enzimática e reduz os níveis de folato intra-celulares (Chave, K. J. *et al.*, 2003).

Subsequentemente, a hipótese segundo a qual a deficiência localizada de folato no tecido cervical pode propiciar o desenvolvimento de displasia cervical, criando um microambiente favorável à sua progressão, baseou-se em duas observações fundamentais (Weinstein, S. J. *et al.*, 2001). Primeiro, foram identificadas anomalias megaloblásticas em mulheres utilizadoras de anti-contraceptivos orais que, na ausência de deficiência sistémica de folato ou vitamina B₁₂, regrediam após suplementação com folato. Posteriormente, demonstrou-se que a displasia cervical melhorava e/ou regredia após suplementação com folato (Meyskens, F. L. and Manetta, A., 1995; Alberg, A. J. *et al.*, 2000). Noutro estudo, (Butterworth, C. E. *et al.*, 1992) demonstrou existir uma relação entre a infecção por HPV-16, os níveis de folato eritrocitário e o risco de displasia cervical (Butterworth, C. E. *et al.*, 1992). Em concordância com outros, os autores verificaram que a depleção das reservas de folato sanguíneas aumenta o efeito de HPV-16, fumo do tabaco e paridade no risco de displasia. Mulheres com reduzida concentração sanguínea de folato e infecção por HPV-16+ apresentaram 5x maior risco de displasia cervical. No entanto, como a deficiência em folato não é carcinogénica *per si*, as células deficientes em folato devem ser mais susceptíveis à acção de outros agentes carcinogénicos, favorecendo o desenvolvimento da displasia (Butterworth, C. E. *et al.*, 1992; Childers, J. M. *et al.*, 1995). Esta hipótese é suportada pelo facto de células CHO crescidas em meio deficiente em folato mostrarem 10x maior frequência de aberrações cromossómicas e maior susceptibilidade à acção carcinogénica de outras genotoxinas (Eichholzer, M. *et al.*, 2001).

Uma associação inversa entre os níveis de folato na dieta e a persistência da infecção por HPV foi, adicionalmente, verificada no estudo de (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992). Por comparação de mulheres com maiores concentrações de folato eritrocitário relativamente a outras com menores concentrações, as últimas apresentaram maior prevalência da infecção por HPV-16. Uma correlação inversa, forte e estatisticamente

significativa entre os valores de folato eritrocitário e o risco de displasia cervical foi descrita (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992).

Devido às diferentes formas de avaliação da concentração do folato, e de forma a evitar discrepâncias na análise dos resultados, deve considerar-se a medida do folato eritrocitário como forma de avaliação da concentração de folato ingerido a longo-prazo. Esta é uma medida exacta que representa o consumo de folato ao longo de vários meses. O folato sérico representa o seu consumo a curto-prazo, e está correlacionado com as medidas de folato cervical depositadas localmente. Uma aproximação à medida de folato cervical deve ser feita pela medição do folato sérico (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992; Alberg, A. J. *et al.*, 2000).

A difícil medição e padronização da concentração de folato é justificada por um conjunto de factores condicionantes de grande disparidade nesta avaliação. Elevada variabilidade inerente à análise de diferentes populações é, naturalmente, condicionante do respectivo padrão genético, escolhas alimentares e comportamentais praticadas pela amostra. Adicionalmente, o considerado valor de concentração normal de folato é variável entre laboratórios. Apesar de uma concentração de folato sérico $<3\text{ng/ml}$ ser, geralmente, considerada baixa (Weinstein, S. J. *et al.*, 2001), foram definidos índices de consumo de folato na dieta (*Dietary Folate Equivalents*, DFEs) de forma a ultrapassar esta discrepância. De acordo com estes, a dose diária de folato recomendada a mulheres adultas não grávidas é $320\text{ }\mu\text{g}$ (Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002; National Academy of Sciences, F., 2010). Disparidades na medição do folato ou avaliação do respectivo consumo são, ainda, devidas às diversas formas de preparação e confecção alimentar, assim como à diferente biodisponibilidade do folato nos alimentos. Estas podem condicionar a quantidade de folato ingerido, enquanto disparidades inter-individuais na taxa de absorção fazem variar a concentração de folato no organismo (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992; Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002). Por isso, pode recorrer-se, alternativamente, à medição da homocisteína sérica, pois esta é um biomarcador sensível da desregulação do metabolismo dos grupos de 1 carbono. Está fortemente relacionada com a disponibilidade de folato intra-celular e inversamente relacionada com a concentração de folato sérico. Porque tanto o folato como a vitamina B₁₂ são necessários à conversão da homocisteína a metionina, elevadas concentrações de homocisteína podem surgir em resposta à baixa concentração de folato e/ou vitamina B₁₂ (Alberg, A. J. *et al.*, 2000; Weinstein, S. J. *et al.*, 2001). Como esta é também um marcador da baixa concentração de outras vitaminas do complexo B, a sua elevada concentração pode ser um marcador mais fiável do risco de cancro cervical invasivo que a baixa concentração de folato (Weinstein, S. J. *et al.*, 2001; García-Closas, R. *et al.*, 2005).



2. Objetivos

2. Objectivos

Com a estruturação deste projecto estabeleceu-se um objectivo geral e um conjunto de objectivos específicos derivados deste, cuja execução se pretendeu cumprir ao longo do estudo desenvolvido:

Objectivo geral

Conhecer o risco de cancro do colo uterino e o respectivo perfil de resposta à quimiorradioterapia, estudando os genótipos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T.

Objectivos específicos

- Analisar a frequência dos polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T num grupo de mulheres sem evidência de lesão cervical ou doença oncológica e compará-la com outras populações controlo, bem como num grupo de mulheres com diagnóstico de neoplasia do colo uterino.

- Avaliar a existência de associação entre a frequência destes polimorfismos e o risco de neoplasia do colo uterino. Caracterizar esta associação recorrendo às medidas da Epidemiologia Clínica consideradas mais adequadas ao contexto.

- Avaliar a existência de associação entre a frequência destes polimorfismos e a variação da resposta à quimiorradioterapia com cisplatina, modelo de terapêutica primário no tratamento do cancro do colo uterino no Instituto Português de Oncologia do Porto.

A avaliação da relação de ambos os polimorfismos com esta neoplasia tem como finalidade última facilitar a personalização da medicina e, assim, melhorar a qualidade de vida de mulheres com neoplasia do colo uterino.



3.1 Caracterização da População

Para o estudo dos polimorfismos *XRCC1* Arg399In e *GGH* -401C>T utilizou-se um estudo analítico, do tipo observacional caso-controlo retrospectivo. Para tal, foram constituídos dois grupos de análise, casos e controlos. Os indivíduos analisados são do sexo feminino, Caucasianos, Portugueses, provenientes da região Norte de Portugal. Todas as amostras foram utilizadas com o seu conhecimento e consentimento prévios, após validação de Consentimento Informado, de acordo com o protocolo de Helsínquia.

Do grupo de casos fizeram parte quinhentos e oitenta e um (581) indivíduos com diagnóstico histopatológico de lesão cervical tratados no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional de Oncologia do Porto (IPOFG), nos quais se avaliou a frequência genotípica de ambos os polimorfismos. A análise das respectivas características clínico-patológicas foi limitada à informação disponível nos processos clínicos das pacientes. A idade média dos casos analisados foi 49 anos (desvio padrão = 12.71) e a mediana 47 anos. Aquando do diagnóstico, potenciais factores de confundimento comportamentais e clínico-patológicos foram avaliados, entre os quais utilização de anti-contraceptivos orais e hábitos tabágicos, o tipo histológico e o estadió tumoral. Dos parâmetros comportamentais avaliados, verificou-se que de um total de 260 mulheres, 50.4% utilizavam anti-contraceptivos orais. De 415 mulheres avaliadas quanto aos hábitos tabágicos, 18,6% destas eram fumadoras e 75.7% não fumadoras. Informação relativa ao perfil tumoral de 523 mulheres permitiu verificar que 24 mulheres (4.6%) apresentaram LSIL, 87 (16.6%) HSIL, 330 (63.1%) carcinoma espinocelular, 52 (9.9%) adenocarcinoma e 30 mulheres (5.7%) apresentaram outros tipos de neoplasia menos comuns. Informação relativa ao tratamento primário esteve disponível para 302 pacientes, das quais 34 (3.4%) foram submetidas a cirurgia, 3 (0.3%) a cirurgia seguida de quimiorradioterapia e 12 (1.2%) a cirurgia seguida de radioterapia. O modelo de quimiorradioterapia foi aplicado a 193 mulheres (19.5%). Destas, 155 (80.3%) apresentaram carcinoma espinocelular, 22 (11.4%) adenocarcinoma e 16 (8.3%) outros tipos histológicos de cancro do colo uterino menos comuns. A respectiva estratificação em função do estadió tumoral demonstrou que a maioria das mulheres tratadas com quimiorradioterapia apresentava doença em estadió IIB (N=82, 59.9%).

O grupo controlo foi constituído por trezentos e trinta e quatro (334) indivíduos do sexo feminino, sem evidência de outra neoplasia ou doença não neoplásica. Apresentaram idade média de 35 anos (desvio padrão = 10.96) e mediana 37 anos. Foram recrutados do Banco de Dadores de Sangue do Instituto Português de Oncologia do Porto. A caracterização da amostra é apresentada no Quadro 2 e Quadro 3.

3. Material e Métodos

Quadro 2 - Caracterização da amostra em função das respectivas características comportamentais, clínico-patológicas e tratamento primário.

Caracterização da amostra	Controles	Casos
Idade média	37.65	48.58
ACO		
Sim	-	131 (50.4%)
Não	-	96 (36.3%)
Tabagismo		
Sim	59 (35.3%)	82 (18.6%)
Não	108 (64.7%)	333 (75.7%)
Tipo Vs Grau Histológico		
LSIL	-	24 (4.6%)
HSIL	-	87 (16.6%)
Carcinoma espinocelular	-	330 (63.1%)
Adenocarcinoma	-	52 (9.9%)
Outros	-	30 (5.7%)
Tratamento primário		
Cirurgia	-	34 (3.4%)
Cirurgia – QT/RT	-	3 (0.3%)
Cirurgia – RT	-	12 (1.2%)
Quimioradioterapia	-	193 (19.5%)
Outros	-	60 (6.1%)

ACO, Anti-contraceptivos orais; LSIL, *Low-grade intraepithelial lesion*; HSIL, *High-grade intraepithelial lesion*; QT, Quimioterapia; RT, Radioterapia

^a Os dados apresentados são relativos à informação disponível para cada uma das características analisadas

3. Material e Métodos

Quadro 3 - Caracterização do subgrupo amostral tratado com quimiorradioterapia, em função do tipo histológico e estadio tumoral.

Quimiorradioterapia (N=193)	
Tipo Histológico	
Carcinoma espinocelular	155 (80.3%)
Adenocarcinoma	22 (11.4%)
Outros	16 (8.3%)
Estadio FIGO	
IB2 + IIA2	18 (13.1%)
IIB	82 (59.9%)
IIII	32 (23.4%)
IVA	5 (3.6%)

3.2 Procedimentos Laboratoriais

A cada uma das mulheres seleccionadas foi aplicada uma técnica padronizada de colheita intravenosa, para recolha de 8 mL de sangue periférico em tubos de colheita contendo solução de EDTA para preservação anticoagulante.

3.2.1 Extracção de DNA Genómico

Imediatamente após recolha das amostras de casos e controlos, o plasma sanguíneo foi separado da fracção celular do sangue por centrifugação a 3000 rpm, durante 10' a 4°C. O sobrenadante (plasma) foi armazenado a -80°C. Para o isolamento do DNA genómico recorreu-se à técnica de associação sílica-membrana e, para tal, ao *kit* comercial de extracção e purificação de DNA QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®).

Este procedimento, caracterizado por adsorção, lavagem e eluição, baseia-se na grande afinidade de ligação do DNA à membrana de sílica-gel que reveste as colunas de centrifugação. De forma a reduzir a repulsão entre o DNA e as partículas de sílica deve ser utilizada uma solução tampão de elevada carga iónica e baixo pH. A presença adicional de resinas iónicas envolvidas em solução alcoólica na membrana permite a desnaturação de proteínas contaminantes.

De acordo com as instruções do fabricante, 20 µL de Proteinase K foram misturados com 200 µL de plasma. Seguidamente, 200 µL de tampão AL foram adicionados à mistura e homogeneizados no *vortex* durante 15". Seguidamente, a amostra foi incubada a 56°C por 10' e brevemente centrifugada. 200 µL de etanol foram acrescentados à solução, posteriormente centrifugada. A mistura foi transferida para uma outra coluna e centrifugada a 8000 rpm por 1'. Seguiram-se as duas etapas de lavagem da solução, caracterizadas pela adição de 500 µL de solução tampão AW1, centrifugação a 8000 rpm por 1' e adição da solução tampão AW2, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3'. Estas duas soluções-tampão contendo etanol apresentam condições salinas e de pH que garantem a eliminação de proteínas, polissacarídeos, sais e outros contaminantes da amostra inibidores da reacção de polimerização em cadeia (PCR). A etapa final do processo de purificação do DNA corresponde à sua eluição em tampão de eluição AE ou água. O DNA foi posteriormente armazenado a -20°C para preservação da amostra a longo-prazo.

3.2.2 Genotipagem dos Polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T

Para a genotipagem das variantes *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T recorreu-se à técnica *Real-Time* PCR, de acordo com o modelo de discriminação alélica *TaqMan* assay (Figura 15). Para análise dos resultados recorreu-se ao *software* Sequence Detection System ABI 7300, versão 1.2.3 (Applied Biosystems).

Este procedimento permite detectar e quantificar os produtos de PCR em tempo real à medida que o DNA-alvo é amplificado, ao mesmo tempo que permite reduzir a probabilidade de contaminação, mistura de reagentes ou perda de amostra.

Baseado na utilização de uma sonda oligonucleotídica de ligação ao DNA, esta técnica baseia-se na discriminação alélica por emissão de fluorescência. Para tal, requer a ligação de dois fluorómetros (VIC[®]; FAM[™]) à extremidade 5' de cada uma das sondas de discriminação alélica, assim como a ligação adicional de uma molécula *minor groove binder* (MGB) à extremidade 3', de forma a estabilizar as sondas na cadeia de DNA complementar. O fluorómetro repórter emite energia sob a forma de fluorescência, enquanto o outro actua como *quencher* não fluorescente aceitador de energia, quando estão próximos. Assim, a energia emitida pelo primeiro e específica do alelo em estudo, é absorvida pelo *quencher* sem ser detectada, até que a ligação da sonda ao DNA permita o afastamento dos fluorómetros e a sua identificação na fase exponencial da reacção. A sua clivagem é feita pela AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase do fluorómetro associado à sonda, e cria, deste modo, um sinal de fluorescência detectado pelo sistema *Real-Time* PCR. A discriminação alélica ocorre por emparelhamento selectivo de uma das sondas, ou ambas perante heterozigotia, utilizando, para tal, a sequência complementar entre os *primers forward* e *reverse*.

No estudo do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln a sonda marcada com o fluoróculo VIC[®] associou-se ao alelo selvagem (GGGTTGGCGTGTGAGGCCTTACCTCCGGGAGGGCAGCCGCCGACGCATGCG), enquanto a sonda FAM[™] se associou ao alelo variante (GGGTTGGCGTGTGAGGCCTTACCTCTGGGAGGGCAGCCGCCGACGCATGCG).

No estudo da variação *GGH* -401C>T, a sonda marcada com o fluoróculo VIC[®] associou-se ao alelo mais comum e FAM[™] ao alelo variante (CTGGCCAACCCAGGTCCTCGAGAGGAGAGGTTGGGTGTCCCCGGCCGAGTT; CTGGCCAACCCAGGTCCTCGAGAGGGGAGGTTGGGTGTCCCCGGCCGAGTT, respectivamente).

A reacção foi efectuada para um volume de 6 µL/caso, contendo 2.5 µL de 2x

3. Material e Métodos

Taqman Universal Master Mix, 0.125 μL de 40x SNP assay, 2.375 μL de água e 1 μL de DNA genómico (~90 ng). As condições da reacção ilustram-se no Quadro 4. A Figura 15 ilustra um dos resultados obtidos.

Quadro 4 - Condições da reacção de *Real-Time PCR* utilizadas na genotipagem dos SNPs *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T.

<i>XRCC1</i> Arg399Gln (Assay ID: C__622564_10) <i>GGH</i> -401C>T (Assay ID: C__27512347_10)		Ciclos
Activação de DNA Polimerase	95°C, 10'	45
Desnaturação	92°C, 15''	
Extensão	60°C, 1'	

De forma a assegurar controlo de qualidade na execução do protocolo, dois controlos negativos foram incluídos em cada teste de genotipagem e a análise de parte das amostras foi repetida no final do estudo, nas mesmas condições utilizadas inicialmente.

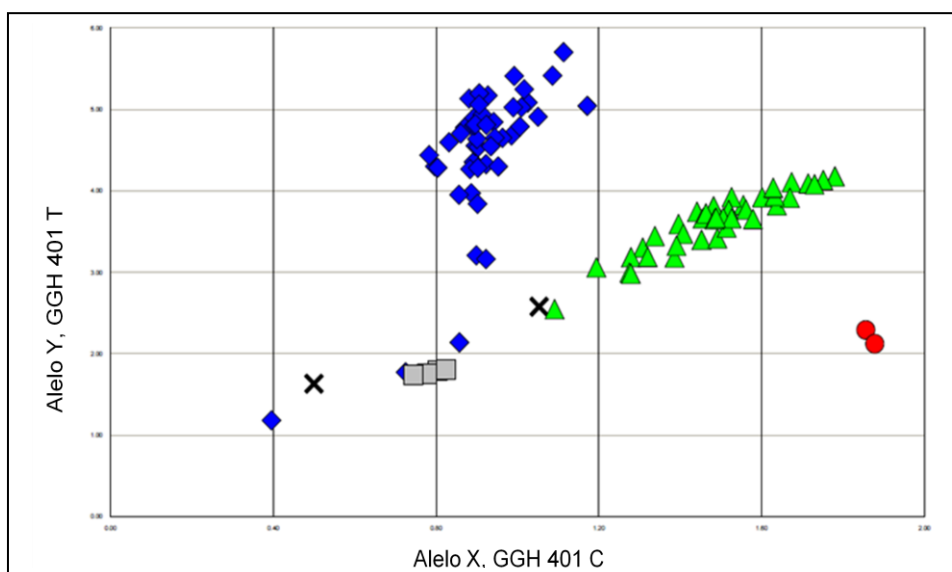


Figura 15 - Representação de um *Real-Time PCR* relativo ao SNP *GGH* -401C>T (Azul: genótipo TT; Vermelho: genótipo CC; Verde: genótipo CT; Cinza: controlos negativos).

3.3 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados recorreu-se ao *software* estatístico SPSS (Versão 16.5, SPSS Inc., 2010), tendo como objectivo esclarecer a relação existente

3. Material e Métodos

entre os polimorfismos analisados e o risco de lesão do colo uterino e, adicionalmente, a relação existente entre estes SNPs e a sobrevivência de mulheres com cancro do colo uterino submetidas a tratamento com quimioradioterapia com cisplatina.

Variáveis categóricas foram analisadas nos grupos de casos e controlos considerando as respectivas distribuições genotípicas e características clínico-patológicas, designadamente tipo e grau histológico da lesão cervical e estadio tumoral FIGO. Para tal, recorreu-se à análise do qui-quadrado (χ^2), com um nível de significância de 5%. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2 e considerado estatisticamente significativo se inferior a 0.05. O valor de *Odds Ratio* (OR) e respectivo intervalo de confiança (IC) 95% foi utilizado como estimativa do valor de risco relativo. OR representa a magnitude da associação entre os genótipos analisados e o risco primário de cancro ou ausência de resposta ao tratamento em estudos caso-controlo (Hennekens, C. H. *et al.*, 1988).

Os modelos de análise de agrupamento dos genótipos, designadamente *XRCC1* Arg399Gln genótipo GG Vs portador A e *GGH* -401C>T genótipos CC/CT Vs TT, foram utilizados para analisar o risco de cancro e ausência de resposta à terapêutica associados a estes polimorfismos.

Nas análises de sobrevivência, foram estudadas curvas de probabilidade cumulativa relativas à resposta ao tratamento ou ausência desta, utilizando-se o método de Kaplan-Meier e respectivo teste de *Log Rank*, e uma análise por regressão de Cox. O intervalo livre de progressão (ILP) foi definido como o período de tempo (em meses) decorrido entre a data de diagnóstico e o momento de recorrência da doença.



4. Resultados

4.1 Análise do Polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln

4.1.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Suscetibilidade a Cancro do Colo Uterino

A distribuição de genótipos do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln entre o grupo de casos e controlos analisados ilustra-se na Figura 16. De 581 casos de lesão cervical, 43.0% são homozigóticos para o alelo G (399Arg), 42.5% são heterozigóticos e 14.5% são homozigóticos para o alelo A (399Gln). De 344 controlos, a frequência genotípica apresentada foi 43.9%, 43.0% e 13.1%, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genotípicas deste polimorfismo nos grupos de casos e controlos ($p=0.842$) (Quadro 5). Verificou-se, adicionalmente, de acordo com um teste ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, que as frequências genotípicas esperadas e observadas nesta amostra não diferem significativamente ($\chi^2=0.83$).

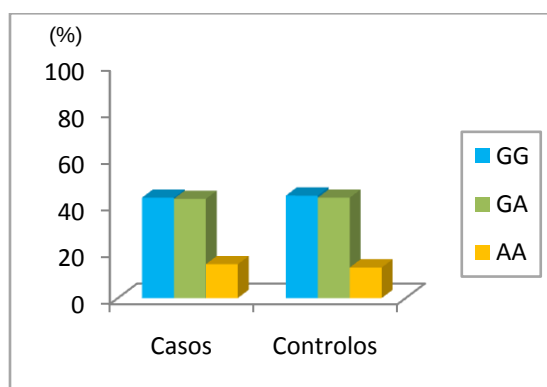


Figura 16 – Representação gráfica da distribuição das frequências do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln nos grupos de casos e controlos.

Estudando a potencial relação deste polimorfismo com o risco de lesão do colo uterino, verificou-se que *XRCC1* Arg399Gln não se relaciona significativamente com o risco de lesão cervical ($p=0.842$). O agrupamento de genótipos GG Vs portador A não revelou significância estatística ($p=0.797$). Consistentemente, portadores do alelo A não apresentaram maior risco de HSIL, carcinoma espinocelular ou risco de progressão de uma lesão pré-neoplásica a carcinoma espinocelular ($p>0.05$). A relação entre o genótipo *XRCC1* e a idade de diagnóstico da doença foi seguidamente testada, recorrendo a uma análise Kaplan-Meier. Esta não foi, contudo, estatisticamente significativa ($p=0.235$).

4. Resultados

Quadro 5 – Genotipagem dos grupos de casos e controlos relativamente ao risco de cancro do colo uterino: Influência do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln.

		Controlos	Casos			
		N=344 (%)	N=581 (%)	OR	IC (95%)	p^a
Genótipos	GG	151 (43.9%)	250 (43.0%)	1	Referência	0.842
	GA	148 (43.0%)	247 (42.5%)			
	AA	45 (13.1%)	84 (14.5%)			
Agrupamento de genótipos	GG	151 (43.9%)	250 (43.0%)	1	Referência	-
	Portador A	193 (56.1%)	331 (57.0%)	1.020	0.876-1.187	0.797

^a Teste χ^2

4.1.2 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimioradioterapia com Cisplatina

Para ambos os polimorfismos, a análise farmacogenómica efectuada foi restrita ao subgrupo amostral submetido a tratamento com quimioradioterapia com cisplatina (N=193).

Dos 174 casos analisados para o polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln verificou-se, pela análise das respectivas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, que este não se associa ao valor médio de sobrevivência global das pacientes com cancro do colo uterino submetidas a este regime terapêutico ($p=0.952$). Apesar de, após o agrupamento de genótipos GG Vs portador A se ter verificado que portadores do alelo A apresentam um período médio de sobrevivência global superior aos restantes, esta relação não foi significativa (valor médio de sobrevivência por genótipo – GG: 77 meses Vs Portador A: 82 meses, $p=0.850$) (Figura 17). A análise complementar da respectiva curva de Kaplan-Meier revelou que, tanto mulheres portadoras do alelo variante, como do genótipo mais frequente apresentam uma taxa de sobrevivência a 5 anos $\geq 70\%$ (período médio de sobrevivência por genótipo GG: 70% Vs Portador A: 72%).

4. Resultados

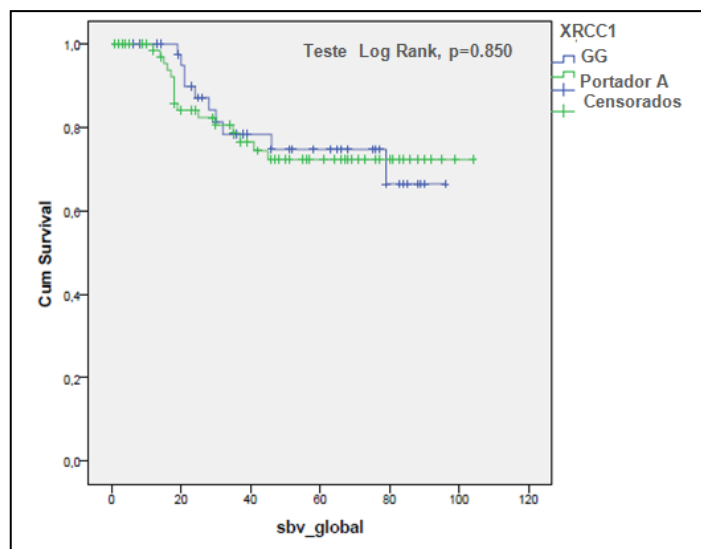


Figura 17 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste *Log Rank* após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: Análise da influência do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln.

Seguidamente, a estratificação da amostra em função do estadió tumoral FIGO foi feita de acordo com as classes de análise IB2+IIA2, IIB, III e IVA, tendo em consideração os grupos convencionalmente definidos para tratamento. Esta análise demonstrou, sem significância estatística, que o polimorfismo se associa a maior período de sobrevivência global nos estádios iniciais IB2+IIA2 e no estadió III (período médio de sobrevivência por genótipo/estádios IB2+IIA2 – GG: 63 meses Vs Portador A: 77 meses, $p=0.458$; estadió IIB - GG: 84 meses Vs Portador A: 81 meses, $p=0.330$; estadió III – GG: 66 meses Vs Portador A: 74 meses, $p=0.920$). A análise complementar das respectivas curvas de Kaplan-Meier revelou que a sobrevivência a 5 anos de mulheres portadoras de genótipo variante foi de 86% no estadió IIB, mas de apenas 50% no estadió III.

Por fim, a análise do intervalo livre de progressão revelou que, de um total de 93 mulheres analisadas, apenas 9 apresentaram recidiva tumoral, não tendo sido encontradas diferenças entre os dois genótipos analisados.

4.2 Análise do Polimorfismo *GGH* -401C>T

4.2.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Suscetibilidade a Cancro do Colo Uterino

A Figura 18 mostra a distribuição dos genótipos do polimorfismo *GGH* -401C>T nos grupos de casos e controlos. De 581 casos de lesão cervical, 9.8% são

4. Resultados

homozigóticos para o alelo C (genótipo CC), 43.9% são heterozigóticos (genótipo CT) e 46.3% são homozigóticos para o alelo T (genótipo TT). De 334 controles analisados para este polimorfismo, a frequência genotípica apresentada foi 8.7%, 44.9% e 46.4%, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre estas frequências genotípicas nos grupos de casos e controles ($p=0.845$). Verificou-se, ainda, que estas estão de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, não sendo registadas diferenças significativas entre as frequências genotípicas esperadas e observadas ($\chi^2=0.75$).

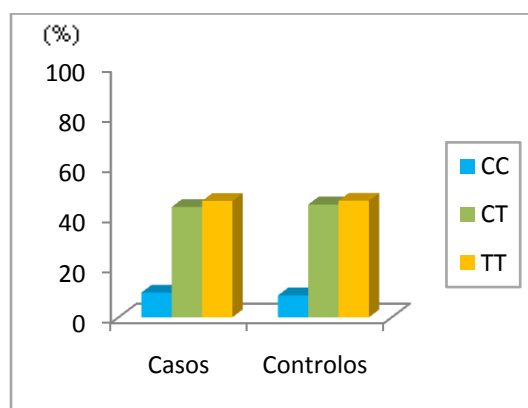


Figura 18 - Representação gráfica da distribuição das frequências do polimorfismo *GGH* -401C>T nos grupos de casos e controles.

A análise da relação deste polimorfismo com o risco de lesão do colo uterino não revelou significância estatística ($p=0.845$). Após o agrupamento de genótipos CC/CT Vs TT não se obteve significância estatística ($p=0.975$) (Quadro 6). Do mesmo modo, este polimorfismo não se associou de forma significativa ao aparecimento de HSIL, carcinoma espinocelular ou à progressão de uma lesão pré-neoplásica a carcinoma espinocelular ($p>0.05$). A relação entre os genótipos *GGH* -401 CC/CT Vs TT e a idade de diagnóstico da doença também não se revelou estatisticamente significativa ($p=0.156$).

Quadro 6 - Genotipagem dos grupos de casos e controles relativamente ao risco de cancro do colo uterino: Influência do polimorfismo *GGH* -401C>T.

		Controlos N=334 (%)	Casos N=581 (%)	OR	IC (95%)	p ^a
Genótipos	CC	29 (8.7%)	57 (9.8%)	1	Referência	0.845
	CT	150 (44.9%)	255 (43.9%)			
	TT	155 (46.4%)	269 (46.3%)			
Agrupamento de genótipos	CC/CT	179 (53.6%)	312 (53.7%)	1	Referência	-
	TT	155 (46.4%)	269 (46.3%)	0.998	0.881-1.131	0.975

^a Teste χ^2

4.2.2 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimioradioterapia com Cisplatina

Da análise dos 167 casos estudados para o genótipo *GGH* verificou-se que a presença do genótipo TT se associa de forma estatisticamente significativa a maior período médio de sobrevivência, após análise combinada dos genótipos CC/CT Vs TT (período médio de sobrevivência por genótipo - CC/CT: 72 meses Vs TT: 91 meses, $p=0.035$) (Figura 19). A posterior análise da respectiva curva de Kaplan-Meier revelou que a sobrevivência global a 5 anos de mulheres portadoras do genótipo variante é de 84%, comparativamente a mulheres portadoras de genótipos CC/CT, cuja taxa de sobrevivência em igual período é 64% (Figura 19).

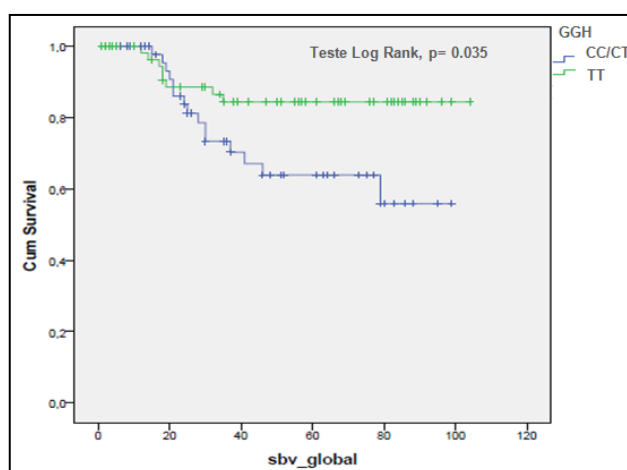


Figura 19 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste *Log Rank* após quimioradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: Análise da influência do polimorfismo *GGH* -401C>T, após agrupamento de genótipos CC/CT Vs TT.

Este grupo foi, seguidamente, estratificado em função do estadiotumoral FIGO. Embora mulheres de genótipo variante apresentem, consistentemente em todos os estadios analisados, maior período médio de sobrevivência, esta diferença não é significativa (período médio de sobrevivência por genótipo/estadios IB2+IIA2 - CC/CT: 60 meses Vs TT: 80 meses, $p=0.504$; IIB - CC/CT: 72 meses Vs TT: 91 meses, $p=0.146$; estadio III - CC/CT: 66 meses Vs TT: 75 meses, $p=0.428$). A análise das respectivas curvas de Kaplan-Meier revelou que mulheres de genótipo TT apresentam uma taxa de sobrevivência a 5 anos de 87.5% em estadios IB2 + IIA2, 84% no estadio IIB e 78% no estadio III. Representam-se na Figura 20 as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier relativas aos estadios IIB e III.

4. Resultados

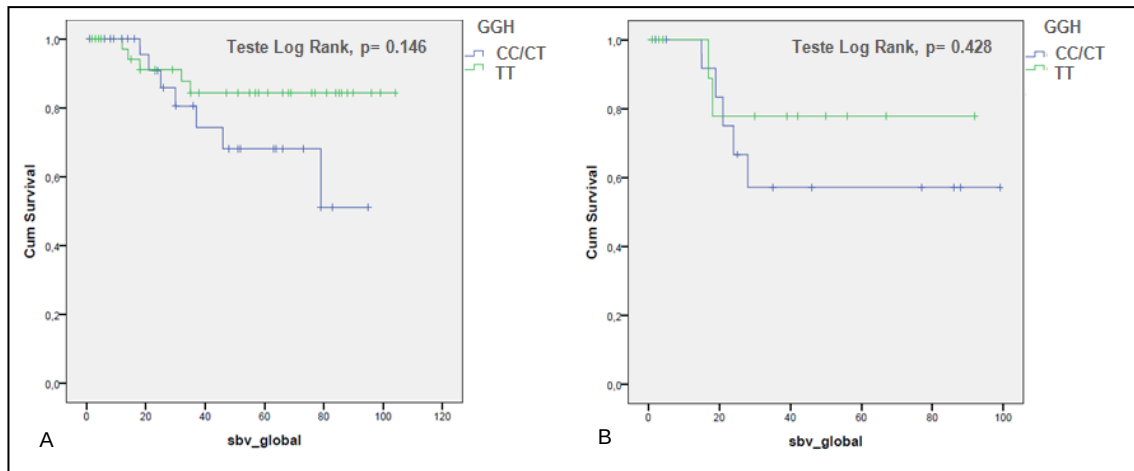


Figura 20 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste *Log Rank* após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: Análise do polimorfismo *GGH* -401C>T após estratificação da amostra por estadiotumoral; (A) estadiotumoral IIB; (B) estadiotumoral III.

Suportando estes resultados, uma análise por regressão de Cox mostrou a tendência de portadores do alelo C apresentarem maior risco de morte relativamente a indivíduos de genótipo TT, considerando as variáveis genótipo *GGH* -401TT e estadiotumoral (HR=0.451, IC 95% 0.185-1.097, p=0.079) (Figura 21).

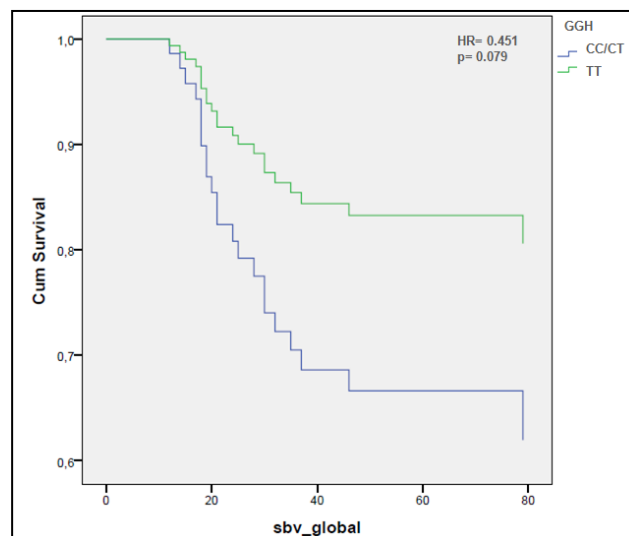


Figura 21 – Curvas de sobrevivência obtidas por regressão de Cox e respectivo valor de *Hazard Ratio* após quimiorradioterapia com cisplatina em pacientes com cancro do colo uterino: Análise das variáveis *GGH* -401TT e estadiotumoral.

Por fim, a análise do respectivo intervalo livre de progressão não evidenciou diferenças entre os dois grupos de genótipos analisados (CC/CT: 81 meses Vs TT: 91 meses, p=0.593).



5. Discussão dos Resultados

No que se refere à caracterização da amostra, o facto de a idade média das pacientes estudadas ser de 49 anos esteve de acordo com o intervalo de idades no qual o diagnóstico de neoplasia cervical é mais comum (<50 anos) (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004). Apesar de a infecção por HPV ocorrer precocemente, é o prolongado estadio pré-neoplásico de 15-20 anos associado à progressão do ciclo de vida viral e, consequentemente, da displasia cervical, que torna este intervalo de idades mais susceptível à neoplasia do colo uterino (Franco, E. L. *et al.*, 2001).

Adicionalmente, também dados de natureza comportamental, potenciais factores de risco para o aparecimento e/ou progressão de lesão cervical a neoplasia, foram recolhidos durante a análise dos processos clínicos das pacientes (N=581). Considerou-se a utilização de anti-contraceptivos orais e os hábitos tabágicos, pois evidências na literatura sugerem um envolvimento dos anti-contraceptivos orais na variação das reservas de folato intra-celulares e do fumo do tabaco na indução de dano oxidativo e imunossupressão local, potencialmente associados à progressão da neoplasia do colo uterino. A importância do tabaco como factor de risco da neoplasia cervical é sublinhada pelo facto de alguns dos seus componentes, designadamente nitrosaminas, já terem sido detectados nas células cervicais. O enfraquecimento da resposta imune em fumadoras traduz-se no reduzido número de células de *Langerhans* detectado no tecido cervical, bem como na menor probabilidade de eliminação da infecção (Giuliano, A. R. *et al.*, 1997; Matos, A. *et al.*, 2005). Alguns estudos apontam, ainda, a potencial acção indirecta do fumo do tabaco sobre as reservas de folato cervicais, devido à inactivação biológica do folato pelos respectivos componentes (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004).

Apesar de estes agentes poderem actuar como potenciais factores de confundimento relativamente à acção das variantes genéticas estudadas, a recolha de dados relativos aos hábitos tabágicos serviu apenas para efeitos de comparação entre os grupos de casos e controlos. Não foi possível explorar adicionalmente o papel do tabaco no risco de neoplasia cervical, pois esta informação não esteve disponível para a totalidade da amostra. Do mesmo modo, dados relativos à utilização de anti-contraceptivos não estão disponíveis para os controlos. Por isso, não foi possível estabelecer uma comparação entre estes e o grupo de casos, não sendo possível confirmar o potencial papel modulador destes na progressão da lesão cervical. Uma comparação adicional entre casos e controlos relativamente a outros conhecidos factores de risco desta neoplasia, nomeadamente a multiparidade, não pôde ser estabelecida, pois estes não estão disponíveis na amostra de dadores.

Relativamente às características clínico-patológicas da amostra, o facto de esta apresentar maior frequência de carcinoma espinocelular relativamente a adenocarcinoma

(63.1% e 9.9%, respectivamente) e, por sua vez, este ter apresentado maior frequência que os restantes tipos histológicos (5.7%) esteve de acordo com os dados epidemiológicos conhecidos. O carcinoma espinocelular contabiliza, aproximadamente, 75% de todas as neoplasias do colo uterino, enquanto o adenocarcinoma representa 10%-15% destas. Os restantes tipos histológicos constituem apenas percentagens residuais deste modelo tumoral.

5.1 Distribuição das Frequências Genotípicas dos Polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T em Populações Controlo

A distribuição da incidência e mortalidade da neoplasia cervical é caracterizada por uma grande variabilidade entre diferentes etnias. Tomando como exemplo dados relativos aos Estados Unidos da América, sabe-se que a incidência do cancro cervical é 45% superior em mulheres de origem Africana relativamente a mulheres de origem Caucasiana, e 65% superior em mulheres Hispânicas relativamente a mulheres Caucasianas. A taxa de mortalidade revela dados semelhantes, já que são as mulheres de origem Africana e Hispânica que apresentam maiores taxas de mortalidade (50% e 45% superior à de mulheres Caucasianas, respectivamente) (Society, A. C., 2009). Embora as causas desta complexa discrepância não estejam, ainda, totalmente identificadas, pensa-se que estejam inter-ligadas, num processo parcialmente explicado pelo diferente estatuto sócio-económico das comunidades emigrantes, bem como pela diferente possibilidade de acesso aos serviços de educação e saúde que as caracteriza. Por fim, deve ser a herança genética de cada etnia, assim como a sua variabilidade inter-individual, conferida pelos polimorfismos genéticos, cuja frequência difere entre populações, a explicar estas discrepâncias (Society, A. C., 2009).

Considerando o polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln como exemplo, diferentes frequências genotípicas e alélicas entre etnias foram descritas (Quadro 7).

5. Discussão dos Resultados

Quadro 7 - Análise comparativa da frequência do alelo variante 399A entre diferentes etnias

Origem da população	Grupo Étnico	Frequência genotípica			Frequência alélica
		GG	GA	AA	A
Portuguesa (estudo efectuado)	Caucasiano	43.9%	43.0%	13.1%	34.6%
-	Caucasiano	-	-	-	34.7% ^a
-	Asiático	-	-	-	26.5% ^a
-	Africano	-	-	-	15.5% ^a
Sudeste do Brasil	Caucasiano	45%	41%	14%	34% ^b
EUA	Caucasiano	38%	49%	13%	37% ^{b; c}
Itália	Caucasiano	43%	47%	10%	39% ^b
Sudeste do Brasil	Africano	53%	42%	5%	26% ^b
EUA	Africano	69%	28%	3%	17% ^{b; c}
Egipto	Egípcio	77%	19%	4%	14% ^{b; d}
Taiwan	Asiático	53%	43%	4%	26% ^{b; c}
China	Asiático	57%	35%	8%	26% ^{b; c}
Coreia	Asiático	60%	36%	4%	22% ^{b; c}
EUA	Caucasiano	46%	44%	10%	32% ^e
	Caucasiano	43%	41%	16% ^f	-
	Africano	80%	19%	1%	11% ^e
	Africano	74%	24%	2% ^f	-

^a (Hu, Z. *et al.*, 2005); ^b (Duarte, M. C. *et al.*, 2007); ^c (Lunn, R. M. *et al.*, 1999); ^d (Abdel-Rahmana, S. Z. *et al.*, 2000); ^e (Gao, R. *et al.*, 2008); ^f (Duell, E. J. *et al.*, 2001)

Numa meta-análise de (Hu, Z. *et al.*, 2005), diferenças estatisticamente significativas foram descritas entre as populações Caucasiana, Asiática e Africana relativamente à frequência do alelo variante A ($p < 0.00001$). A posterior avaliação do risco de cancro em função do genótipo variante revelou, após estratificação em função do tipo de cancro e grupo étnico, que indivíduos portadores de genótipo AA não apresentam maior risco neoplásico.

Diferenças significativas foram, igualmente, obtidas ao comparar duas populações de origem Norte-Americana e diferente etnia, verificando-se que a frequência do alelo variante é superior em indivíduos Caucasianos relativamente a Afro-descendentes ($p = 0.0067$). Verificou-se, por fim, que a frequência do genótipo variante é, nas populações consideradas nesta análise bibliográfica e, à semelhança dos nossos resultados (GG: 43.9%; AA: 13.1%), inferior à frequência do genótipo selvagem. A

frequência obtida na nossa população aproxima-se da de outras populações Caucasianas, de origem Brasileira, Norte-Americana e Italiana (Lunn, R. M. *et al.*, 1999; Duarte, M. C. *et al.*, 2007) (Quadro 7).

No que se refere ao polimorfismo *GGH* -401C>T, um estudo analisando a frequência desta variação em indivíduos Indianos saudáveis mostrou que 61% dos indivíduos considerados, provenientes da região Ocidental da Índia, apresentou o alelo variante 401T, valor superior ao reportado anteriormente para uma população do Norte do país (25%). Adicionalmente, 38% dos indivíduos apresentavam alelo C, comparativamente a 75% da população do Norte do país. A grande diversidade que caracteriza esta população pode explicar estes resultados (Ghodke, Y. *et al.*, 2011). Embora as frequências obtidas na nossa população sejam diferentes das reportadas (CC: 8.7%, TT: 46.4%), o facto de o alelo variante T ser mais comum que o alelo C é um factor comum a parte da população Indiana.

A elevada heterogeneidade das populações analisadas, factor explicativo destas discrepâncias, poderá dever-se a fluxos migratórios e cruzamentos entre diferentes etnias, considerando as características genéticas e ambientais próprias de cada uma delas (Duarte, M. C. *et al.*, 2007).

5.2 Análise do Polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln

5.2.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Susceptibilidade a Cancro do Colo Uterino

O gene *XRCC1* é um dos mais importantes genes de reparação do DNA. Codifica a proteína de suporte da via BER *XRCC1* e integra a via de reparação do DNA SSBR, nas quais não só identifica o local da lesão, como participa activamente na sua reparação. Embora mais de 60 polimorfismos já tenham sido identificados no gene *XRCC1*, a variação *XRCC1* Arg399Gln é, dos três mais descritos na literatura, a mais frequentemente implicada no risco neoplásico ou variação da resposta ao tratamento com compostos derivados da platina. Não só apresenta maior frequência do alelo variante na população, como ainda ocorre no domínio interactivo BRCT1 (Gossage, L. *et al.*, 2009).

Embora a *XRCC1* não tenha actividade catalítica, os resíduos de aminoácidos nas interfaces de ligação dos complexos multiproteicos e os resíduos presentes nos locais activos têm uma função enzimática. Polimorfismos no gene *XRCC1* têm, por isso, potencial acção sobre a eficiência da proteína na reparação do DNA, podendo fazer

variar a susceptibilidade para cancro e outras patologias (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009).

A análise da literatura mostrou, no entanto, que os dados epidemiológicos disponíveis são controversos. Esta disparidade pode ser atribuída ao estudo de diferentes modelos tumorais e respectiva natureza heterogénea, análise de diferentes amostras populacionais e respectivas etnias, características genéticas e envolvimento ambiental próprios, estabelecimento de diferentes *endpoints* em estudos de resposta ao tratamento e/ou natureza poligénica do efeito de alguns modelos de tratamento oncológico (Jeon, Y.-T. *et al.*, 2005; Farkasova, T. *et al.*, 2008).

Porque a frequência do polimorfismo na amostra foi muito próxima entre os grupos de casos e controlos (14.5% Vs 13.1%, respectivamente) (Quadro 5) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p=0.842$). Esta é uma das explicações encontradas para o facto de este polimorfismo não se associar de forma significativa ao risco de HSIL, carcinoma espinocelular ou progressão de uma lesão pré-neoplásica a carcinoma espinocelular ($p>0.05$) nesta amostra. Quando se avaliou a relação deste polimorfismo com a precocidade de aparecimento desta, verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos (idade média de diagnóstico da doença - GG: 52 anos; GA: 53 anos; AA: 50 anos, $p=0.235$), o que poderia sugerir a ausência de influência deste polimorfismo no desenvolvimento de neoplasia cervical nesta amostra. A hipótese de inexistência de relação entre este polimorfismo e o risco de neoplasia cervical tinha já sido colocada num estudo avaliando a relação entre o SNP *XRCC1* Arg399Gln e o risco de neoplasmas e neoplasia uterina (Wu, M.-T. *et al.*, 2003).

Pela análise da literatura verificou-se, no entanto, que este SNP é muitas vezes considerado um factor de risco para cancro. Maior risco de doença e progressão não devem ser apenas condicionados pela reduzida capacidade de reparação do DNA directamente associada à presença do alelo variante, mas também devidos a alterações genéticas concomitantes, decorrentes da instabilidade genómica gerada pela ineficiência na reparação do dano no DNA. Alguns dos estudos favoráveis a esta hipótese baseiam-se em modelos funcionais que ilustram a alteração da conformação proteica na presença do alelo variante. Utilizando modelos dinâmicos, demonstrou-se que a conversão 399 Arg→Gln altera a conformação normal do domínio BRCT1 da proteína onde a variação ocorre, assim como a respectiva estrutura secundária, o que poderia condicionar a interacção de *XRCC1* com as proteínas PARP1 e PARP2 (Hu, Z. *et al.*, 2005; Sterpone, S. and Cozzi, R., 2010). No entanto, o facto de a via SSBR não ter sido interrompida após a introdução desta variação genética sugere a manutenção de um nível basal de

actividade em células onde a variação está presente (Shen, M. R. *et al.*, 1998; Han, J. *et al.*, 2004). O facto de esta ser uma reparação ineficaz poderá contribuir para o risco neoplásico (Sterpone, S. and Cozzi, R., 2010).

Por outro lado, um conjunto de características comuns aos portadores deste polimorfismo, muitas delas condicionantes e/ou associadas a maior risco de cancro, já foi descrito. Estas decorrem da reduzida efectividade de reparação do DNA e permanência de lesões não reparadas, o que aumenta a instabilidade genómica e facilita a progressão neoplásica. Um exemplo claro é a permanência de quebras de cadeia simples no DNA, as quais se não reparadas, podem ser convertidas a quebras de cadeia dupla, potencialmente letais, durante a sua replicação. Estas associam-se, por sua vez, a deleções e translocações cromossómicas e aumento da taxa de mutação (Caldecott, K. W., 2003; Sterpone, S. and Cozzi, R., 2010). Nas células variantes foram, ainda, encontrados marcadores de dano no DNA, designadamente, persistência de aductos de DNA, elevados níveis de aductos de polifenol, maior frequência de trocas de cromátídeos irmãos em células mononucleadas do sangue e mutações no gene p53 (Au, W. W., 2006; Cao, Y. *et al.*, 2006). Contudo, alguns autores demonstraram que estas alterações não se devem apenas à presença do alelo variante, mas à sua acção combinada com alguns agentes mutagénicos, nomeadamente, o fumo do tabaco ou a radiação ionizante e agentes de quimioterapia (Lunn, R. M. *et al.*, 1999; Hu, J. J. *et al.*, 2001; Au, W. W., 2006). Consistente com estes dados, maior risco de aparecimento de neoplasmas, como leiomioma uterino (Jeon, Y.-T. *et al.*, 2005), ou neoplasias como cancro gástrico já foi associado a algumas destas características. A acção do tabaco sobre o risco neoplásico deve ser, no entanto, contextualizada no modelo tumoral estudado, tendo em conta a respectiva percentagem de risco atribuível em cada modelo tumoral.

Embora a acção oxidante e imunossupressora de alguns componentes do tabaco tenha sido descrita ao nível das células cervicais, pode colocar-se a hipótese que a sua acção combinada com o resultado da variação *XRCC1* Arg399Gln não seja suficiente ao desenvolvimento de uma neoplasia. Esta hipótese está de acordo com o postulado para cancro da bexiga, cancro do esófago, cancro da pele não melanoma e linfoma, nos quais se verificou que portadores do alelo variante têm menor risco de cancro relativamente a portadores do alelo mais frequente (Goode, E. L. *et al.*, 2002; Farkasova, T. *et al.*, 2008). Dados relativos a cancro da mama, cancro do pulmão e cancro da cabeça e pescoço revelaram resultados inconsistentes (Goode, E. L. *et al.*, 2002; Costa, S. *et al.*, 2007). Estes dados suportam a hipótese que este SNP possa aumentar ou diminuir a susceptibilidade a cancro consoante a amostra estudada, o tipo e o local da neoplasia, bem como outros elementos de reparação do DNA com os quais interage no tecido

considerado. Devem ser os factores genéticos e ambientais com os quais as respectivas variantes alélicas se relacionam, consoante a população e o modelo tumoral analisados, a coordenar a função de XRCC1 (Goode, E. L. *et al.*, 2002; Wu, M.-T. *et al.*, 2003; Chung, H. H. *et al.*, 2006; Ladiges, W. C., 2006; Costa, S. *et al.*, 2008).

Por fim, pode colocar-se a hipótese que, na presença de dano severo no DNA, as células tenham capacidade de activar precocemente a apoptose e, assim, reduzir a incidência neoplásica. Esta hipótese é suportada por dados experimentais obtidos em cancro da pele não melanoma e cancro da mama (Han, J. *et al.*, 2004; Costa, S. *et al.*, 2008). Avaliando mulheres que apresentaram mais de 5 queimaduras solares severas ao longo da vida, foi demonstrada uma associação inversa e estatisticamente significativa entre o alelo variante e o risco de cancro. Quando avaliadas mulheres que reportaram não ter sofrido nenhuma queimadura solar, o alelo variante não mostrou associação significativa com a neoplasia (Han, J. *et al.*, 2004). Consistentemente, os autores defendem que o alelo variante se associa ao risco de cancro da pele num contexto de baixos níveis de dano no DNA, mas não perante lesões irreparáveis. Perante lesões mais extensas, graves ou associadas a maior instabilidade genómica, as células sem capacidade de reparação efectiva do DNA devem activar a apoptose.

Raciocínio semelhante poderá ser adoptado na evolução da neoplasia cervical, caracterizada pela acumulação de aberrações genéticas e, desde logo, pela inactivação dos genes supressores tumorais *p53* e *Rb* pelas oncoproteínas virais E6 e E7, respectivamente. Considerando a presença do polimorfismo XRCC1 Arg399Gln e a consequente reduzida capacidade de reparação do DNA, esta variação poderá assumir um papel negligenciável, ou mesmo protector, no desenvolvimento de cancro cervical, desde que a apoptose das células malignas seja activada precocemente.

Segundo (Costa, S. *et al.*, 2008), o diferente papel atribuído à proteína XRCC1 poderá ser, assim, variável consoante as respectivas variantes alélicas Ihe conferem uma função particular num determinado contexto de interacção com outras vias biológicas activas no tecido analisado.

Para explicar a ausência de relação estatisticamente significativa entre a variação genética XRCC1 Arg399Gln e o risco de neoplasia cervical nesta amostra dois factores devem ser considerados. Por um lado, a semelhante frequência da sua distribuição entre casos e controlos. Por outro, o facto de XRCC1 ser uma proteína de suporte da via BER e o papel vital da reparação do DNA na sobrevivência da célula, o que poderá condicionar o fenótipo resultante de uma alteração nesta proteína e determinar a sua

forma de manifestação. Nesta amostra, como noutros modelos tumorais, poderá não existir qualquer relação entre este polimorfismo e o risco de neoplasia cervical.

5.2.2 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimioradioterapia com Cisplatina

Apesar de a reduzida capacidade de reparação do DNA estar associada a um maior risco de doença, esta também se correlaciona com o maior período médio de sobrevivência de doentes com cancro tratados com agentes derivados da platina. Melhores *outcomes* foram registados em cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC), CCR, cancro da cabeça e pescoço e cancro da mama (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009). Utilizando como exemplo o cancro da cabeça e pescoço, maior sensibilidade à quimioterapia com platinos foi descrita em portadores do alelo A relativamente a portadores dos restantes genótipos. Estudos avaliando CCR e CPNPC revelaram resultados inconsistentes (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009).

Relativamente ao carcinoma cervical, tem sido sugerido que o *outcome* destes paciente tratados com platinos pode ser modulado pelo *status* do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009). À semelhança de outras variações em genes de reparação do DNA, esta confere ao tumor reduzida capacidade de reparação do dano e, por isso, está associada a instabilidade genómica e maior probabilidade de aparecimento de uma segunda neoplasia. Por outro lado, a remoção ineficiente do dano no DNA permite a manutenção dos aductos de platina na dupla hélice, associando-se à apoptose das células tumorais e, consequentemente, a uma melhoria da resposta ao tratamento (Chung, H. H. *et al.*, 2006). Resultados inconsistentes podem ser devidos ao facto de SNPs em genes de reparação do DNA se associarem a diferentes *outcomes* pós-tratamento, ao estudo de diferentes modelos tumorais e diferentes etnias.

Múltiplos estudos demonstraram já que a resposta à quimioterapia neoadjuvante com uma combinação de 5-FU+cisplatina é melhorada na presença da variação *XRCC1* Arg399Gln (Chung, H. H. *et al.*, 2006). Verificou-se, adicionalmente, que a resposta ao tratamento melhora à medida que o número de alelos A aumenta, o que suporta o papel da variação *XRCC1* Arg399Gln na sensibilização das células malignas à acção dos platinos (Chung, H. H. *et al.*, 2006). Contudo, o facto de o regime terapêutico ser composto por uma combinação de derivados da platina e 5-FU levantou a hipótese que polimorfismos em genes do metabolismo do folato tenham contribuído para a melhoria da resposta ao tratamento (Chung, H. H. *et al.*, 2006).

Os nossos resultados estão de acordo com estes, apesar da ausência de significância estatística. A análise segundo o agrupamento de genótipos GG Vs portador A permitiu observar que mulheres portadoras do alelo variante tendem a viver mais tempo que mulheres de genótipo GG (valor médio de sobrevivência por genótipo – GG: 77 meses; Portador A: 82 meses, $p=0.850$).

Deve ainda considerar-se que a presença da variação 399 Arg→Gln afectando o domínio de interacção das proteínas XRCC1 e PARP1 pode impedir ou, pelo menos, retardar o desenvolvimento de mecanismos de resistência às drogas nas células tumorais portadoras da mutação. Sabe-se que a interacção destas proteínas é importante à substituição de outras proteínas associadas à dupla hélice durante a via BER, de forma a manter a acessibilidade das enzimas de reparação ao DNA. A alteração conformacional do domínio BRCT1 resultante do polimorfismo poderá ser, assim, suficiente para que a detecção e reparação da lesão seja atrasada ou inexistente. Esta hipótese é suportada pelo facto de maiores níveis de marcadores de dano no DNA terem sido detectados em portadores do alelo variante relativamente a portadores do alelo G, devido à inadequada reparação destes (Duell, E. J. W. *et al.*, 2000).

Baseando-nos nos dados acima apresentados, sugere-se que esta variação favoreça a sobrevivência de mulheres com carcinoma cervical tratadas com cisplatina.

Uma análise adicional da sobrevivência de mulheres com cancro do colo uterino na região Norte de Portugal permitiu verificar que os valores obtidos neste estudo são superiores aos reportados para o período de 2000-2006 e, inclusivamente, para a média europeia. Enquanto dados relativos à Região Norte de Portugal e mulheres com carcinoma do colo uterino mostram que a taxa de sobrevivência a 5 anos foi de 60.3%, neste estudo, e perante uma análise da influência do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln, verificou-se que a taxa de sobrevivência aos 5 anos das pacientes analisadas foi superior a 70%. Dados relativos à média europeia mostram, contudo, que a probabilidade de permanecer vivo ao fim de 5 anos após o diagnóstico da doença é de apenas 60.4%. As discrepâncias encontradas podem ser atribuídas ao tamanho e representatividade da amostra analisada, respectivos factores genéticos e ambientais próprios, local de aplicação e qualidade dos cuidados prestados ou respectivo momento de aplicação.

Dados controversos foram, no entanto, descritos. Estudando pacientes tratados com regimes combinados de quimioterapia neoadjuvante com cisplatina + paclitaxel, isofosfamida ou bleomicina, mulheres de genótipo GG apresentaram maior probabilidade de responder favoravelmente à quimioterapia que portadoras do alelo variante A (90.0% Vs 76.92%, respectivamente). O risco de falha na resposta à terapêutica foi 3x maior em portadoras de, pelo menos um alelo A, relativamente a não portadoras. Verificou-se,

ainda, que o alelo variante interfere no nível de expressão da proteína XRCC1. Mulheres portadoras de, pelo menos um alelo A, apresentam maior expressão de mRNA de *XRCC1*, o que correspondeu, por sua vez, a pacientes com pior resposta ao tratamento (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009). Colocou-se a hipótese que os genótipos GA/AA apresentem maior expressão da proteína e se associem a pior prognóstico devido a maior taxa de reparação do DNA e consequente desenvolvimento de resistência ao tratamento. Embora o exacto mecanismo pelo qual esta ocorre continue por esclarecer, a sobre-expressão de outros genes de reparação do DNA já foi descrita noutros modelos tumorais, nomeadamente, carcinoma do ovário (Cheng, X.-D. *et al.*, 2009).

A elevada variabilidade entre diferentes modelos tumorais e amostras estudadas poderá explicar a ausência de conformidade entre os nossos dados e outros descritos na literatura. O facto adicional de estes envolverem a aplicação de quimioterapia neoadjuvante baseada numa combinação de derivados da platina e outros compostos, nomeadamente interferentes no metabolismo do folato, enquanto o nosso estudo se refere a um regime de quimioradioterapia com cisplatina aplicada em regime adjuvante, pode contribuir, adicionalmente, para a discrepância encontrada. O facto de modelos de terapêutica neoadjuvante serem aplicados ao tumor antes de este sofrer qualquer outro tipo de sensibilização terapêutica, pode contribuir para esta discrepância.

Seguidamente, passou-se à análise do intervalo livre de progressão. De um total de 93 mulheres analisadas, apenas 9 apresentaram recidiva tumoral. A respectiva curva de Kaplan-Meier revelou que mulheres portadoras do alelo A apresentam recidiva mais tarde relativamente às restantes, embora sem que uma diferença significativa tenha sido obtida (período de progressão por genótipo – GG: 81 meses Vs Portador A: 87 meses, $p=0.969$). Sugere-se, de acordo com o estudo de (Chung, H. H. *et al.*, 2006) em carcinoma cervical, que mulheres portadoras da variação respondam melhor ao tratamento. A maior eficácia dos agentes alquilantes na eliminação das células tumorais portadoras do polimorfismo, nas quais a eficácia de reparação do DNA está reduzida, deve explicar a sua eliminação precoce.

5.3 Análise do Polimorfismo *GGH* -401C>T

5.3.1 Genotipagem e Associação do Polimorfismo à Susceptibilidade a Cancro do Colo Uterino

GGH é um gene de regulação tecido-específica, cujos níveis de mRNA mais elevados se encontram no fígado, rins, placenta, testículos, glândulas adrenais e salivares. Níveis mais baixos desta enzima são encontrados no baço, pulmão, intestino delgado e leucócitos do sangue periférico (Yin, D. *et al.*, 2003). A enzima codificada é uma glicoproteína intra-celular responsável pela hidrólise dos derivados do folato folil-poliglutamatos e anti-folilpoliglutamatos para regulação da sua concentração intra-celular (Yin, D. *et al.*, 2003; Pollard, C. *et al.*, 2009).

Os estudos que procuraram conhecer o envolvimento de *GGH* no risco da neoplasia e respectivo *outcome* relacionaram-no, nomeadamente, com a sua grande variação inter-individual. Alguns dos polimorfismos identificados afectam directamente a função enzimática, outros associam-se à variação da respectiva estrutura proteica e modulação do risco de doença ou *outcome*. O SNP *GGH* -401C>T, associado à perda de um local de ligação para um factor de transcrição inibitório, aumenta a actividade hidrolítica da enzima sobre os glutamatos e associa-se, consequentemente, à depleção relativa das reservas de folil-poliglutamatos intra-celulares. A sua expressão é, por isso, inversamente proporcional à concentração dos intermediários do folato, pois é a reduzida expressão génica que permite maior acumulação intra-celular da forma poliglutamato do folato. Se o rácio glutamato intra-celular Vs necessidades metabólicas da célula aumenta, a expressão de *GGH* aumenta proporcionalmente. Outros mecanismos reguladores da sua actividade catalítica ou o papel de potenciais co-factores na modulação da sua actividade ainda não são totalmente conhecidos (Yao, R. *et al.*, 1996).

Múltiplos estudos têm associado a sobre-expressão de *GGH* ao aumento da respectiva actividade enzimática. A subsequente depleção dos níveis de folato intra-celulares tem sido associada a um conjunto de alterações celulares, metabólicas e cariotípicas pré-neoplásicas (Odin, E. *et al.*, 2003). Adicionalmente, sabe-se que a depleção de folato intra-celular afecta a síntese, reparação e metilação do DNA e, por isso, o respectivo envolvimento no desenvolvimento neoplásico é biologicamente plausível (Odin, E. *et al.*, 2003). Porque os folilpoli- γ -glutamatos são melhores substratos para a maior parte das enzimas dependentes do folato que os monoglutamatos, a variação *GGH* -401C>T e consequente sobre-expressão enzimática pode resultar numa depleção funcional dos co-factores mais adequados a reacções celulares críticas. A

reduzida disponibilidade de 5,10-metileno-THF na síntese de pirimidinas é uma das suas consequências. Porque esta depleção reduz a síntese de timidilato, o rácio uridilato Vs timidilato aumenta e há, consequentemente, uma acumulação excessiva de uridilato no meio intra-celular. Desta, resulta a desregulação do equilíbrio nucleotídico na célula e a mal-incorporação de uracilo nos locais de timina no DNA. A sua excisão, catalisada pelas enzimas APE1 e uracil-DNA glycosylase, conduz à formação de quebras de cadeia simples de DNA que, se não reparadas, originam rearranjos cromossómicos e instabilidade genómica. Estes ciclos repetitivos de excisão das bases erradamente inseridas na molécula de DNA acentuam a perturbação do processo de reparação, uma vez que a sua eficiência é reduzida perante baixas concentrações de timina. Este “ciclo catastrófico” de reparação do DNA é uma das vias propostas para que a deficiência em folato contribua para a carcinogénese (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992; Blount, B. C. *et al.*, 1997; Ottone, F. *et al.*, 1997; Duthie, S. J., 1999; Eichholzera, M. *et al.*, 2001; DeVos, L. *et al.*, 2008). A mal-incorporação de uracilo, em combinação com alterações no padrão de metilação do DNA, deve ajudar a explicar alterações citogenéticas visíveis em células com baixas concentrações de folato e em maior risco de transformação maligna. Esta hipótese, preferencialmente aplicável a tecidos de rápida proliferação, ajuda a explicar por que motivo a deficiência em folato tem sido associada ao risco de neoplasia epitelial, fundamentalmente CCR, cancro da mama, cancro do pulmão e cancro do colo uterino (Blount, B. C. *et al.*, 1997; Duthie, S. J., 1999; DeVos, L. *et al.*, 2008). Por outro lado, verificou-se que, em concentrações normais, o folato tem uma acção anti-tumorigénica, prevenindo a formação de alterações celulares epiteliais potencialmente pré-neoplásicas (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992).

Embora as mais fortes evidências ligando a acção do folato e a origem e progressão da neoplasia tenham sido descritas em CCR, outros factores de risco da malignidade, susceptíveis de alterar a sensibilidade das células a vírus oncogénicos e outros agentes carcinogénicos, foram descritos na neoplasia do colo uterino (Butterworth, C. E. *et al.*, 1992; Eichholzera, M. *et al.*, 2001). Consistentemente, células crescidas em meios com reduzidas concentrações de folato manifestam aberrações cromossómicas semelhantes às de muitos tumores (Blount, B. C. *et al.*, 1997; Duthie, S. J., 1999). Algumas destas alterações devem-se à alteração do padrão de metilação de regiões génicas particulares. Perturbações do estado de metilação do DNA podem constituir alterações regionais reguladoras do estado de activação de importantes genes supressores tumorais ou oncogenes e foram já associadas à depleção das reservas de folato cervicais (Duthie, S. J., 1999; Ziegler, R. G. *et al.*, 2002). Por exemplo, foi detectada hipometilação e consequente sobre-expressão de proto-oncogenes em células

tumorais, relativamente às células normais envolventes. Esta foi associada à redução dos níveis intra-celulares de 5-metil-THF e/ou metionina e à consequente depleção de S-adenosilmetionina (Duthie, S. J., 1999; Eichholzer, M. *et al.*, 2001). Não apenas a perturbação do metabolismo dos grupos de 1 carbono reduz a síntese de S-adenosilmetionina e, consequentemente, a metilação do DNA, como o *status* de folato sérico e cervical é inversamente proporcional à taxa de hipometilação do tecido cervical (Ziegler, R. G. *et al.*, 2002). Verificou-se, adicionalmente, que, à semelhança de outras neoplasias epiteliais, a taxa de hipometilação na neoplasia do colo uterino é crescente com a progressão da lesão, desde a displasia ao carcinoma invasivo, onde é mais frequente (Fowler, B. M. *et al.*, 1998; Powers, H. J., 2005). O seu efeito deve ser, no entanto, mais importante no desenvolvimento de estadios precoces da neoplasia cervical relativamente à doença avançada. Não apenas induzidas por variações no metabolismo do folato ou na dieta, as alterações no padrão de metilação génica podem ser induzidas pela própria infecção por HPV (Duthie, S. J., 1999; Piyathilake, C. J. *et al.*, 2007).

Como a relação entre a depleção do folato sérico e cervical, hipometilação do DNA e progressão neoplásica a partir de displasia é ainda inconsistente, a possibilidade de a depleção de folato ser um dos seus factores reguladores e não etiológico único deve ser considerada (Fowler, B. M. *et al.*, 1998). Adicionalmente, têm surgido evidências experimentais demonstrando que a metilação de regiões regulatórias específicas do genoma de HPV tem um importante papel na transformação celular. Demonstrou-se que a integração de HPV na célula hospedeira é facilitada pela hipometilação de regiões particulares do promotor e, ainda, que parte da regulação da transcrição de HPV, após integração no genoma do hospedeiro, depende da metilação do DNA viral (Fowler, B. M. *et al.*, 1998; Sedjo, R. L. *et al.*, 2002).

Se a concentração normal de folato ajuda a prevenir a incorporação de HPV no genoma do hospedeiro, assim como a regular a respectiva transcrição viral, então este pode ser um dos factores explicativos do facto de apenas algumas infecções progredirem para cancro (Fowler, B. M. *et al.*, 1998). Num estudo efectuado por (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2007), foi demonstrado que mulheres com maiores concentrações de folato têm 73% menor risco de infecção por HR-HPV, de acordo com uma relação inversa, estatisticamente significativa, entre a elevada concentração de folato e o risco de infecção por HR-HPV. O menor risco de persistência da infecção associou-se à maior probabilidade de eliminação desta (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2007). Porque a persistência da infecção por HPV é um mecanismo favorável à progressão da displasia cervical a cancro, os autores sugerem a idade, imunossupressão, deficiências nutricionais, nomeadamente de folato, como potenciais factores moduladores da relação entre a

história natural da infecção por HPV e o hospedeiro (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004). Baixos níveis de folato foram, assim, associados a maior risco de infecção e integração de HPV, assim como à persistência de genótipos de HR-HPV e maior carga viral nas células infectadas (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004; Piyathilake, C. J. *et al.*, 2007). O aumento da expressão de locais frágeis do DNA, coincidentes com um dos locais de integração de HPV-16 e três locais de integração de HPV-18 no genoma do hospedeiro na presença de baixas concentrações de folato, suporta a hipótese de potencial envolvimento do folato na infecção por HPV e respectiva progressão (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2004). Uma revisão efectuada por (García-Closas, R. *et al.*, 2005) verificou, ainda, que o consumo de frutas e vegetais poderia desempenhar um efeito protector sobre a persistência da infecção por HPV, tal como níveis óptimos de folato e vitamina B₁₂ poderão constituir importantes agentes protectores do desenvolvimento neoplásico.

No entanto, a questão se a deficiência em folato é causa ou consequência das alterações displásicas está ainda por responder, pois não é claro se é a deficiência nutricional que aumenta o risco de persistência da infecção por HPV e consequente carcinogénese, ou se é esta que diminui a concentração do folato e outros micronutrientes. A maioria dos resultados indica, contudo, que a deficiência nutricional antecede e tende a favorecer a persistência da infecção e o processo neoplásico subsequente (Butterworth, C. E. *et al.*, 1982; VanEenwyk, J. *et al.*, 1992; Meyskens, F. L. and Manetta, A., 1995). Esta hipótese é suportada pelo facto de o folato inibir ou reduzir o potencial oncogénico viral, bem como pelo facto de este micronutriente prevenir, quando presente em concentrações normais, o aparecimento de aberrações cromossómicas e anomalias genéticas e celulares pré-neoplásicas nas células epiteliais (VanEenwyk, J. *et al.*, 1992; Alberg, A. J. *et al.*, 2000).

No entanto, esta relação pode ser confundida pela presença de micronutrientes antioxidantes nos mesmos alimentos, nomeadamente vitaminas C, E ou carotenóides (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2007). Como os resultados de ensaios randomizados controlados por placebo, estudando a acção da suplementação com folato na reversão de casos de displasia cervical foram inconsistentes, colocou-se a hipótese que esta suplementação seja apenas vantajosa para mulheres nutricionalmente deficitárias (Duthie, S. J., 1999). É importante considerar que é a deficiência nutricional que potencialmente se associa à neoplasia e que, por isso, a suplementação com folato ou outros micronutrientes apenas deve revelar efeitos significativos na prevenção neoplásica de indivíduos com deficiências nutricionais, e não na população em geral ou subgrupos adequadamente nutridos (Key, T. J., 2011).

Ao avaliar a relação entre um micronutriente, como o folato, e o risco e progressão

neoplásicos deve ser, por isso, tida em consideração a sua independência relativamente a outros factores interferentes nesta relação, nomeadamente outros nutrientes presentes nos mesmos alimentos e factores de risco próprios da doença, bem como o estadio em que esta se encontra. A sua acção poderá ser limitada a determinadas fases do desenvolvimento neoplásico (Potischman, N., 1993; García-Closas, R. *et al.*, 2005). Por fim, deve considerar-se que diferentes tumores assumem diferentes comportamentos, e que *GGH* se comporta diferentemente consoante tem uma acção isolada ou combinada com outros genes.

Reflecta-se, ainda, sobre o facto de CCR e carcinoma do colo uterino serem ambas neoplasias de origem epitelial, baseadas numa lesão da mucosa com múltiplas propriedades em comum. A respectiva progressão é faseada e ocorre ao longo de múltiplas etapas de desenvolvimento pré-neoplásico, associadas a um processo inflamatório e desencadeadas pela exposição à acção combinada de agentes carcinogénicos e HPV. Tendo, ainda, em conta que algumas das alterações devidas à depleção do folato cervical e visíveis no epitélio se assemelham às encontradas no epitélio colónico, sugere-se que o efeito de depleção do folato sobre o desenvolvimento de ambas seja semelhante. Em CCR, uma redução gradual da concentração de folato na mucosa adjacente a lesões pré-neoplásicas e carcinoma associou-se à respectiva inflamação (Odin, E. *et al.*, 2003). Porque a depleção em folato afecta os mecanismos de reparação do DNA, desencadeia quebras e rearranjos cromossómicos e altera o padrão de metilação génica, a desregulação do padrão inflamatório da mucosa converte-a no microambiente propício à transformação neoplásica. A contínua exposição aos agentes inflamatórios e imunitários acentua a depleção das reservas de folato e, ciclicamente, torna estas células menos imunocompetentes no combate ao desenvolvimento tumoral (Odin, E. *et al.*, 2003).

Paralelamente, também o risco de neoplasia cervical poderá ser condicionado pela depleção das reservas de folato resultantes da sobre-expressão de *GGH* e exposição à inflamação desencadeada pelo estabelecimento do ciclo de vida de HPV. O facto de a reduzida concentração de folato local se associar ao aparecimento de múltiplos marcadores de instabilidade genómica visíveis em displasia e cancro suporta a hipótese que esta se associe ao risco de neoplasia cervical (Piyathilake, C. J. *et al.*, 2007).

Embora neste trabalho não tenha sido possível avaliar o risco de infecção por HPV e relacioná-lo com a depleção das reservas de folato intra-celulares, os dados disponíveis permitiram estabelecer uma relação entre os reduzidos níveis de folato

cervical e o risco de neoplasia. Como o polimorfismo *GGH* -401C>T se associa a uma depleção do folato intra-celular, poderia colocar-se a hipótese de favorecimento à infecção por HPV e progressão neoplásica, de acordo com os estudos anteriormente apresentados. No entanto, dois pontos devem ser considerados na análise desta relação. Por um lado, e como previamente descrito para o polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln, a genotipagem deste SNP mostrou frequências muito próximas entre os grupos de casos e controlos (frequência do genótipo variante TT: 46.3% Vs 46.4%, respectivamente) (Figura 18), o que demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos amostrais ($p=0.845$). A semelhante distribuição do genótipo variante entre casos e controlos poderá ter contribuído para que uma eventual relação entre o polimorfismo e o risco de neoplasia cervical não fosse visível ($p>0.05$). Por outro lado, deve considerar-se que, nesta amostra, a frequência do genótipo variante é superior à do genótipo selvagem, o que pode ser explicado pela grande disparidade na distribuição das frequências genotípicas entre diferentes etnias e populações do mesmo grupo étnico. Deve considerar-se que, nesta população, o resultado da variação alélica de *GGH* dependerá, além de outros factores genéticos com os quais interage, do ambiente no qual o indivíduo se insere. À luz dos resultados obtidos, deve colocar-se a hipótese que indivíduos portadores do alelo variante sejam protegidos do respectivo efeito pela dieta praticada. Considerando que em Portugal se pratica uma dieta de natureza mediterrânica, caracterizada pela sua riqueza e adequação nutricional em frutas, legumes vegetais e nozes que, entre outros componentes, são ricos em folato, carotenóides e vitaminas antioxidantes (Simopoulos, A. P., 2001; Serra-Majem, L. *et al.*, 2003), sugere-se que a depleção deste micronutriente, induzida pelo polimorfismo, seja compensada pela sua ingestão. Nesta amostra, uma relação entre a depleção de folato intra-celular e o risco de neoplasia cervical poderá, assim, não ser visível.

Concluiu-se, assim, que nesta amostra o polimorfismo *GGH* -401C>T não demonstra uma relação significativa com o risco de neoplasia do colo uterino. Esta poderá dever-se ao facto de não existirem diferenças significativas na distribuição do genótipo variante entre os grupos de casos e controlos, ou à presença de mecanismos compensatórios da depleção de folato intra-celular. Estes deverão reverter os potenciais efeitos de uma sobre-expressão enzimática no metabolismo do folato e vias dependentes e, assim, mascarar o potencial efeito favorável deste polimorfismo ao risco de neoplasia cervical, visível noutras amostras e modelos tumorais. Considerando, ainda, que o risco de cancro resulta da interacção de múltiplos genes e factores ambientais ao longo da vida, deverá colocar-se a hipótese que, nestas condições, uma variação isolada em *GGH* não seja suficiente para desencadear a doença.

5.3.2 Anti-Contraceptivos Orais e Risco Neoplásico

Como o efeito da baixa concentração de folato é isoladamente fraco e por vezes controverso, a sua relação com factores de risco da doença e outros micronutrientes reguladores da sua concentração tem sido considerada. Estudos relativos ao consumo de anti-contraceptivos orais têm mostrado resultados promissores, pois verificou-se que em mulheres utilizadoras destes agentes foram observadas anemia megaloblástica associada à deficiência em folato, reduzidas concentrações de folato sérico e eritrocitário, má absorção de compostos derivados do folato, assim como anomalias nas respectivas citologias cervico-vaginais, semelhantes a anomalias pré-neoplásicas (Potischman, N., 1993; Weinstein, S. J. *et al.*, 2001). Esta relação entre os anti-contraceptivos orais e os níveis de folato intra-celulares tem por base a acção das hormonas esteróides ao nível dos órgãos-alvo. Estas participam na síntese proteica, estimulam a síntese do DNA e a replicação celular. Como tal, aumentam a utilização de folato como co-factor enzimático durante o metabolismo celular. Consequentemente, a sua utilização deverá contribuir para uma depleção das reservas de folato intra-celulares, resultando nas anomalias citológicas cervico-vaginais identificadas em mulheres utilizadoras destes agentes (Butterworth, C. E. *et al.*, 1982). O seu consumo tem sido, adicionalmente, associado ao maior risco de aparecimento de displasia pós-infecção com HPV, o que é suportado pela identificação de menores concentrações de folato eritrocitário em mulheres utilizadoras de anti-contraceptivos orais, relativamente a não utilizadoras. Depleção mais acentuada foi obtida em mulheres com displasia cervical, sugerindo que uma perturbação localizada e reversível do metabolismo do folato condiciona o processo displásico (Butterworth, C. E. *et al.*, 1982). Embora a acção dos anti-contraceptivos orais na normal absorção ou eliminação dos derivados do folato tenha sido postulada, dados relativos à sua influência sobre a depleção dos reservatórios de folato cervical são, ainda, inconsistentes (Butterworth, C. E. *et al.*, 1982; Potischman, N. *et al.*, 1991; Butterworth, C. E. *et al.*, 1992; Potischman, N., 1993; Jo, H. and Kim, J. W., 2005). Segundo alguns autores, a média dos valores de folato eritrocitário e sérico não é significativamente diferente entre mulheres utilizadoras e que nunca tinham utilizado anti-contraceptivos orais. Sugere-se, por isso, que estes possam ter apenas um efeito ligeiro na concentração de folato, actuando como factor precipitante ou contribuinte desta depleção (Potischman, N. *et al.*, 1991; Weinstein, S. J. *et al.*, 2001).

Considera-se, ainda, que a sua acção sobre a neoplasia cervical possa resultar da ectopia cervical subsequente à toma dos anti-contraceptivos orais e consequente maior susceptibilidade à infecção por HPV, bem como do efeito das hormonas esteróides sobre

a proliferação celular e nível de expressão viral (Castle, P. E. *et al.*, 2006).

Neste estudo não foi observada associação entre o genótipo variante, a depleção das reservas de folato intra-celulares e a utilização de anti-contraceptivos orais ($p=0.204$), numa análise de acordo com o estadio tumoral e o agrupamento de genótipos CC/CT Vs TT. Verificou-se, assim, que a utilização de anti-contraceptivos orais não constituiu um factor de risco à depleção das reservas de folato nesta amostra. O facto de a concentração de folato cervical, sérico e/ou eritrocitário não ter sido avaliada para potencial correlação com os resultados obtidos, constitui uma das suas limitações.

5.3.3 Associação do Polimorfismo com a Resposta a Quimioradioterapia com Cisplatina

A interrupção de reacções metabólicas críticas à sobrevivência celular, devido à depleção das reservas de folato intra-celulares, deve ser suficiente à activação precoce da apoptose nas células variantes. De acordo com esta hipótese, os nossos resultados mostram uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo variante TT e a maior sobrevivência global após tratamento com quimioradioterapia com cisplatina ($p=0.035$) (Figura 19). Apesar de, consistentemente se ter demonstrado que portadores do alelo variante apresentam maiores taxas de sobrevivência relativamente a portadores dos restantes genótipos, não se verificou existir uma relação entre o genótipo variante e o estadio tumoral (Figura 20). Considerando que a depleção dos níveis de folato é um fenómeno contínuo desencadeado pelo polimorfismo, os respectivos efeitos não devem ser imediatos. O limiar de activação da apoptose só deve ser atingido quando o limiar mínimo das reservas de folato intra-celulares é alcançado e, assim, ultrapassado o limite máximo de sobrevivência das células, determinante da apoptose. Por isso, os efeitos da depleção dos níveis de folato intra-celulares não devem ser, em estadios iniciais da doença, suficientemente fortes ou graves à perturbação do funcionamento normal do metabolismo da célula. Contudo, à medida que a redução dos níveis de folato se acentua, graves perturbações na síntese e reparação do DNA, síntese *de novo* de grupos metil e metabolismo dos grupos de 1 carbono devem ser visíveis em clones de células tumorais como antecedentes da apoptose e resultado de um efeito protector do polimorfismo sobre a sobrevivência destas mulheres. Nesta amostra, a reduzida amostragem de casos presente em cada grupo de análise após estratificação por estadio (IB2+IIA2, N=22; IIB N=100; III, N=32; IVA, N=1) poderá ter condicionado os resultados obtidos.

Verificou-se, adicionalmente, pela análise das respectivas curvas de Kaplan-Meier que mulheres portadoras homozigóticas do alelo variante T apresentam, em estádios IB2+IIA2, uma taxa de sobrevivência a 5 anos de 87.5%, 84% no estadio IIB e 78% no estadio III, cujo declínio está de acordo com o natural agravamento das respectivas características clínico-patológicas. A Figura 20 ilustra os dados relativos aos estádios IIB e III. Verificou-se, ainda, que mulheres portadoras de genótipo TT vivem, em média, mais 25 meses relativamente às restantes, o que reforça a hipótese de potencial envolvimento do genótipo *GGH* no prolongamento da sobrevivência destas mulheres. Suportando a hipótese postulada, uma análise da sobrevivência por regressão de Cox demonstrou igualmente uma tendência para que portadores do alelo C tenham maior risco de morte relativamente a indivíduos de genótipo variante TT, considerando as variáveis genótipo *GGH* -401TT e estadio tumoral FIGO (HR=0.451, IC 95% 0.185-1.097, p=0.079). Este modelo de análise da sobrevivência, cuja medida de Hazard Ratio corresponde ao quociente de risco entre os grupos em análise, permite comparar o risco de ocorrência de um evento entre duas amostras ou subgrupos amostrais. Neste caso particular, esta medida permitiu-nos observar que mulheres de genótipo TT têm tendencialmente 0.5x menor probabilidade de morrer em qualquer mês considerado, relativamente a mulheres portadoras do alelo C.

Para explicar estes resultados, duas hipóteses inter-ligadas devem ser consideradas. Por um lado, deve ser considerado o comportamento tumoral acima explorado, à luz do qual estes resultados estão de acordo com o esperado. A depleção dos níveis de folato intra-celulares, devida à variação *GGH* -401C>T, pode condicionar a interrupção de reacções celulares críticas. Quando o metabolismo celular não pode mais ser mantido, o limiar de sobrevivência da célula é alcançado e a apoptose activa. Deve considerar-se, adicionalmente, que as curvas de sobrevivência apresentadas se referem ao período pós-tratamento com cisplatina+radioterapia, logo o comportamento das células tumorais não deve ser apenas condicionado pela depleção isolada das reservas de folato. A respectiva interacção com os agentes de tratamento deve ser ponderada. Como a depleção das reservas de folato intra-celulares reduz a efectividade dos mecanismos de reparação do DNA, esta aumenta a instabilidade genómica induzida pela exposição aos agentes alquilantes e radiação ionizante utilizados no tratamento anti-neoplásico (Duthie, S. J., 1999). O mecanismo pelo qual esta depleção em folato interfere na reparação do DNA já foi descrito, relacionando-o com a desregulação da concentração e síntese de precursores dos ácidos nucleicos (Duthie, S. J., 1999; Rampersaud, G. C. *et al.*, 2002). Paralelamente ao maior risco neoplásico, também o período de permanência dos aductos intra-cadeia DNA-cisplatina nas células tumorais

aumenta perante reduzidos níveis de folato intra-celulares e respectivas consequências, o que favorece a hipótese de envolvimento deste polimorfismo no prolongamento da acção citotóxica da cisplatina sobre as células malignas (Ottone, F. *et al.*, 1997).

Estabelecendo um paralelismo com outras drogas anti-neoplásicas interferentes no metabolismo do folato, os anti-folatos, verificou-se que, enquanto alguns estudos estabelecem uma relação entre a sobre-expressão de GGH e a resistência aos anti-folatos (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006), outros demonstraram que a sobre-expressão ectópica de GGH não confere resistência ao tratamento (Cole, P. D. *et al.*, 2001). Colocou-se, assim, a hipótese segundo a qual a sobre-expressão enzimática seja desfavorável à célula na ausência de alterações adaptativas concomitantes. Embora não seja claro o motivo pelo qual esta sobre-actividade enzimática inviabiliza a sobrevivência celular, pensa-se que a sobre-expressão não compensada de GGH perturbe a homeostasia do metabolismo do folato intra-celular (Cole, P. D. *et al.*, 2001; Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).

Estudando a acção anti-neoplásica da cisplatina em linhagens celulares de carcinoma do ovário, explora-se esta hipótese. Os autores justificam o desenvolvimento de resistência tumoral à cisplatina em função dos níveis de folato intra-celulares, relacionando a variação da acção citotóxica da cisplatina com variações no metabolismo do folato (Ottone, F. *et al.*, 1997). De acordo com estes, a sensibilidade à platina relaciona-se, em parte, com uma depleção dos níveis de folato intra-celulares, o que poderá ajudar a explicar os resultados obtidos no nosso estudo. Por outro lado, maiores concentrações de 5,10-metileno-THF e THF, assim como sobre-expressão de enzimas envolvidas na síntese *de novo* de DNA foram observadas em células resistentes à cisplatina. Esta sobre-expressão, susceptível de aumentar a síntese e reparação do DNA, deve impedir a apoptose e favorecer o desenvolvimento de um fenótipo resistente (Ottone, F. *et al.*, 1997). O desenvolvimento de resistência poderá ser devido a mecanismos compensatórios da deficiência de folato intra-celular, os quais deverão impedir que as baixas concentrações de folato atinjam o seu limite máximo, condicionante da viabilidade celular e, portanto, responsáveis pela eliminação das células tumorais (Cole, P. D. *et al.*, 2001).

São as hipóteses acima exploradas que podem ajudar a explicar os resultados obtidos neste trabalho, tal que mulheres tratadas com quimioradioterapia com cisplatina apresentam maiores taxas de sobrevivência global e livre de progressão na presença do genótipo variante, comparativamente a mulheres portadoras de genótipos CC/CT. Pela análise do intervalo livre de progressão se verifica, embora sem significância estatística, que mulheres de genótipo variante apresentam, em média, recidiva 10 meses mais tarde

relativamente às restantes. A ausência de relação significativa pode dever-se à reduzida amostragem de mulheres apresentando recidiva (N=9).

Uma potencial acção combinada entre polimorfismos das vias de reparação do DNA e metabolismo do folato tem vindo a ser estudada em doentes oncológicos tratados com derivados da platina. Como GGH não se relaciona directamente com o mecanismo de acção da cisplatina, alterações quantitativas na actividade da enzima lisossomal podem ter um efeito apenas limitado na concentração da cisplatina intra-celular e, consequentemente, na sua actividade sobre o DNA. Deste modo, variações na sobrevivência destas pacientes podem não ser apenas condicionadas por este polimorfismo, mas também pela respectiva relação com outros genes, nomeadamente *XRCC1*. Num estudo em neoplasia do colo uterino, verificou-se que apesar de *GGH* -401C>T não ter, isoladamente, um efeito significativo na resposta a quimioterapia neoadjuvante com cisplatina/carboplatina + 5-FU/ ectoposido, a análise do respectivo efeito combinado com a variação *XRCC1* Arg399Gln evidenciou significância estatística (Chung, H. H. *et al.*, 2006).

Esta análise à relação do polimorfismo *GGH* -401C>T com o risco de doença e variação da resposta ao tratamento procurou demonstrar, como previamente sugerido, que o folato tem potenciais consequências biológicas, clínicas e farmacológicas (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006). O papel deste polimorfismo como potencial biomarcador preditivo ou de prognóstico na neoplasia do colo uterino, assim como a possibilidade de intervenção farmacológica na correcção das alterações celulares induzidas pela deficiência em folato, deve ser ponderado. Deve considerar que a acção de GGH como biomarcador tumoral tem vindo a ser extensivamente estudada. A elevada heterogeneidade do tecido tumoral deve ser, contudo, considerada na extrapolação de resultados entre diferentes modelos tumorais e diferentes populações, pois grande variação nos níveis de expressão de GGH e outras enzimas associadas ao metabolismo do folato pode ser encontrada em diferentes tecidos. Consequentemente, uma caracterização exaustiva da célula tumoral relativamente à acção da enzima deve ser feita, de forma a identificar características próprias do genoma da célula tumoral que possam ser particularmente determinantes da resposta à terapêutica (Cheng, Q. *et al.*, 2006). Como múltiplos mecanismos podem fazer variar a expressão e função de um único gene e, consequentemente, a farmacogenómica das drogas anti-neoplásicas, a sua identificação é fundamental. Adicionalmente, também a heterogeneidade da amostra deve ser considerada e, por isso, o papel da enzima em diferentes estadios da neoplasia. A sua acção no desenvolvimento e progressão desta devem ser estudados. Tomando como exemplo outros modelos tumorais onde a actividade de GGH como biomarcador

preditivo ou de diagnóstico já foi estudada, verificou-se que uma análise comparativa da expressão de mRNA de *GGH* entre 12 linhagens celulares de cancro da mama e 12 linhagens mamárias não neoplásicas concluiu que a expressão do respectivo mRNA é maior nas amostras tumorais relativamente às amostras normais. Verificou-se, adicionalmente, que a grande heterogeneidade da expressão de *GGH* nas amostras tumorais contrastava com a expressão homogénea da enzima nas amostras normais, o que se pode dever a um potencial envolvimento de *GGH* na carcinogénese, variável consoante a histologia e o grau da neoplasia (Yin, D. *et al.*, 2003). Resultado semelhante foi descrito em CCR, quando uma elevada expressão de *GGH* medida nas células tumorais contrastou com a reduzida expressão enzimática na mucosa normal envolvente ao tumor. Posteriormente, foi sugerido um potencial envolvimento na carcinogénese da bexiga, após ter sido demonstrado que a expressão de *GGH* foi 14x maior em biopsias tumorais comparativamente a amostras normais. Este aumento mostrou-se significativamente correlacionado com o grau de invasividade tumoral, o que permitiu indiciar *GGH* como biomarcador de prognóstico em cancro da bexiga. Foi integrada num modelo combinado de biomarcadores urinários de previsão da sobrevivência livre de doença pós-tratamento com MVAC (MTX, vincristina, doxorubicina, cisplatina) (Pollard, C. *et al.*, 2009). A sobre-expressão enzimática foi, ainda, classificada como importante biomarcador prognóstico em leucemia aguda em resposta ao tratamento com MTX. Em múltiplas linhagens celulares de leucemia ou linfoma, o aumento da actividade de *GGH* tem sido associado ao desenvolvimento de mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida aos anti-folatos (Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006).



6. Conclusão e Perspectivas Futuras

Apesar de a neoplasia do colo uterino ser um dos modelos neoplásicos induzidos por vírus mais bem estudados, e de parte dos respectivos factores causais e/ou envolvidos na progressão neoplásica terem sido já identificados, múltiplas vias biológicas envolvidas neste processo continuam ainda por esclarecer. Urge, assim, identificar e conhecer melhor o papel de cada um dos genes envolvido na neoplasia do colo uterino, assim como dos respectivos polimorfismos.

O presente trabalho teve, por isso, como objectivo maior avaliar a forma como a diversidade genética modula o risco de cancro do colo uterino e a respectiva resposta à quimioradioterapia. Para tal, foi analisada a frequência genotípica dos polimorfismos *XRCC1* Arg399Gln e *GGH* -401C>T numa amostra de doentes com lesões do colo uterino e, posteriormente, comparada com a frequência obtida num grupo controlo. Seguidamente, procurou saber-se se o risco de doença seria determinado pela presença de um ou ambos os polimorfismos, facto que não se demonstrou. O genótipo variante do polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln não influencia o risco de doença nesta amostra. Como a proteína *XRCC1* desempenha funções centrais na via BER, deve considerar-se a possibilidade que uma alteração nesta proteína não seja visível sem a presença de outras variações adicionais na mesma ou outras proteínas com as quais interage.

Posteriormente, estudando o perfil de resposta à quimioradioterapia, sugeriu-se que a presença da variação 399 Arg→Gln favoreça a sobrevivência de mulheres com carcinoma cervical tratadas com cisplatina. Porque esta variação funcional afecta um domínio de interacção entre as proteínas *XRCC1* e *PARP1*, pode colocar-se a hipótese que a ineficiente reparação do DNA prolongue a acção da cisplatina sobre as células tumorais e atrase o desenvolvimento de mecanismos de resistência às drogas nas células tumorais portadoras da mutação.

Ao analisar o polimorfismo *GGH* -401C>T, não foi, igualmente, descrita uma relação significativa entre este gene do metabolismo do folato e o risco de neoplasia cervical. À semelhança do que já foi descrito para outros grupos étnicos, a frequência do genótipo variante é, nesta amostra, superior à do genótipo selvagem. Considerou-se, por isso, a hipótese segundo a qual esta amostra apresente, naturalmente, mecanismos compensatórios da depleção de folato intra-celular constitutivamente activos, de forma a reverter os potenciais efeitos de uma sobre-expressão enzimática no metabolismo do folato e vias dele-dependentes. Estes, tal como a ingestão de folato pela dieta, deverão ajudar a prevenir o desenvolvimento neoplásico.

No que se refere ao perfil farmacogenómico desta amostra, uma relação significativa entre este polimorfismo e a probabilidade de resposta ao tratamento foi

descrita. O facto de o polimorfismo se associar a uma maior probabilidade de resposta ao tratamento com cisplatina-radioterapia poderá ser atribuído ao facto de a depleção das reservas de folato cervicais contribuir para a interrupção de reacções metabólicas críticas à sobrevivência celular, designadamente síntese, metilação e reparação do DNA e de outras moléculas bioactivas. A apoptose deverá ser activa quando o limiar mínimo das reservas de folato intra-celulares é alcançado e, conseqüentemente, o limiar máximo de sobrevivência celular. Pelas análises de sobrevivência efectuadas, mulheres portadoras de genótipo variante TT apresentaram, assim, maiores taxas de sobrevivência global e livre de progressão que mulheres portadoras do alelo selvagem C.

Com a futura aplicação à prática clínica de trabalhos como este pretende-se que os polimorfismos possam vir a ser utilizados como marcadores preditivos do *outcome* ou marcadores de prognóstico característicos do paciente. Utilizados no momento de diagnóstico, poderão estimar a probabilidade de recorrência da doença na ausência de tratamento e, conseqüentemente, actuar como preditores de risco (Yin, J. *et al.*, 2002). A sua aplicação ao cancro do colo uterino é, agora, uma prioridade.

A sua utilização não só permitirá dividir os pacientes em diferentes grupos de risco, bem como fazer uma selecção prospectiva de pacientes em risco de toxicidade severa, tendo como objectivo último a melhoria da sua qualidade de vida. O regime terapêutico adoptado deve variar consoante a subpopulação analisada e respectivas características (Yu, J. J., 2009).

Alternativamente ao estudo de polimorfismos, a análise de haplótipos tem vindo a ser apresentada como boa alternativa ao estudo de polimorfismos em genes individuais. Esta surge numa tentativa de aproximar a relação polimorfismo ↔ fenótipo, justificando-se quando os SNPs analisados estão proximamente localizados no mesmo gene (Le, W. *et al.*, 2005; Skjelbred, C. F. *et al.*, 2006). A análise de haplótipos permite, assim, estudar polimorfismos potencialmente herdados conjuntamente e identificar elementos-chave do aparecimento e/ou evolução da doença (Le, W. *et al.*, 2005).

Esta relação, inicialmente estabelecida a nível genético, deve ser seguidamente comprovada por análises funcionais a nível transcricional, o que permitirá comprovar o papel de cada variação no modo como a doença se desenvolve e se comporta. Esta abordagem multidisciplinar permitirá elaborar o quadro de cada doença à luz da sua componente genética, proteica e de relação com o doente.

Deste modo, considera-se fundamental que, para a validação destes resultados, outros dados sejam produzidos na mesma área, nomeadamente de natureza prospectiva, funcional ou clínica. Caso sejam confirmados, o método de genotipagem dos SNPs poderia ser, adicionalmente, optimizado, de modo a facilitar e amplificar a sua utilização

na prática clínica. Tomando como modelo a neoplasia mamária, e baseando-nos em conjuntos de genes sistematicamente alterados ou polimórficos em cancro do colo uterino, poderia sugerir-se a criação de *chips* de análise molecular. Estes permitiriam a análise de múltiplos genes e a pesquisa das respectivas alterações mais comuns em simultâneo. Este modelo de diagnóstico molecular permitiria prever e monitorizar a evolução da doença e a resposta ao tratamento de forma mais rápida e efectiva.

Sugere-se, adicionalmente, que estes modelos génicos integrassem genes inter-actantes na mesma via biológica ou vias relacionadas, já que resultados isolados apontam neste sentido. Uma interacção entre as proteínas XRCC1 e RAD51 é um exemplo. A relação de polimorfismos no gene *RAD51* com a resposta à quimioterapia com platinos foi já estudada em CPNPC em função da efectividade da reparação do DNA via recombinação homóloga (Nogueira, A. *et al.*, 2009), processo de reparação do DNA no qual também XRCC1 está envolvida. Por outro lado, variações cuja prevalência é elevada no carcinoma do colo uterino deviam ser consideradas. A variação Arg→Pro no codão 72 do gene *TP53* é um exemplo típico. Tendo sido demonstrado que a ligação da proteína E6 de HR-HPV a p53 é mais forte quando o alelo Arg está presente, comparativamente à presença do alelo Pro, este pode ser um importante marcador genético de cancro cervical invasivo em determinadas populações (Sousa, H. *et al.*, 2007).

A Biomedicina trabalha, assim, para que futuramente seja possível definir o perfil molecular de susceptibilidade de cada paciente ou grupo, através do qual possa ser possível definir estratégias de quimioprevenção, identificação de novos marcadores de prognóstico e selecção de novos alvos terapêuticos.



11. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

<http://shjwomenhealthspecialist.blogspot.com/>

- Abdel-Rahmana, S. Z., Solimanb, A. S., et al., 2000. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Letters*, 159(79-86).
- Alberg, A. J., Selhub, J., et al., 2000. The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9(7): 761–764.
- ASCC, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology; The Cervix: Histology of the normal cervix <http://www.asccp.org/edu/practice/cervix/histology.shtml>
- Au, W. W., 2006. Heritable susceptibility factors for the development of cancer. *Journal of Radiotherapy Research*, 47: 13-17.
- Aungsumart, S., Vaeteewoottacharn, K., et al., 2007. Chemoradio resistance in cervical cancer induced by HPV16 e7. *Science Asia*, 33: 5-11.
- Beernink, P. T., Hwang, M., et al., 2005. Specificity of protein interactions mediated by BRCT domains of the XRCC1 DNA repair protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(34): 30206–30213.
- Bharti, A. C., Shukla, S., et al., 2009. Anti-human papillomavirus therapeutics: Facts & future. *Indian Journal Medical Research*, 130: 296-310.
- Blount, B. C., Mack, M. M., et al., 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *PNAS*, 94(7): 3290–3295.
- Brader, K. R., Morris, M., et al., 1998. Chemotherapy for cervical carcinoma: Factors determining response and implications for clinical trial design. *Journal of Clinical Oncology*, 16(5): 1879-1884.
- Burd, E. M., 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1): 1-17.
- Butterworth, C. E., Hatch, K. D., et al., 1982. Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users of oral contraceptives. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 35: 73-82.
- Butterworth, C. E., Hatch, K. D., et al., 1992. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA*, 267(4): 528-533.
- Caldecott, K. W., 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2: 955–969.
- Cao, Y., Miao, X.-P., et al., 2006. Polymorphisms of XRCC1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population. *BMC Cancer*, 6(167).
- Castle, P. E., Jeronimo, J., et al., 2006. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Research*, 66(2): 1218-1224.
- Chave, K. J., Ryan, T. J., et al., 2003. Identification of single nucleotide polymorphisms in

7. Referências Bibliográficas

- the human Gamma-Glutamyl Hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene*, 319: 167-175.
- Cheng, Q., Cheng, C., et al., 2006. Epigenetic regulation of human Gamma-Glutamyl Hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia cells. *The American Journal of Human Genetics*, 79: 264-274.
- Cheng, X.-D., Lu, W.-G., et al., 2009. The association of XRCC1 gene single nucleotide polymorphisms with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(91).
- Childers, J. M., Chu, J., et al., 1995. Chemoprevention of cervical cancer with folic acid: A phase III southwest oncology group intergroup study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4(2): 55-159.
- Chou, W.-C., Wang, H.-C., et al., 2008. Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes Base Excision Repair. *The EMBO Journal*, 27(23): 3140–3150.
- Chung, H. H., Kim, M.-K., et al., 2006. XRCC1 R399Q polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 103: 1031-1037.
- Cole, P. D., Kamen, B. A., et al., 2001. Effects of overexpression of Gamma-Glutamyl Hydrolase on methotrexate metabolism and resistance. *Cancer Research*, 61(11): 4599–4604.
- Cooke, S. L., Temple, J., et al., 2011. Intra-tumour genetic heterogeneity and poor chemoradiotherapy response in cervical cancer. *British Journal of Cancer*, 104(2): 361 – 368.
- Costa, S., Pinto, D., et al., 2007. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: A study on a Portuguese population. *Breast Cancer Research and Treatment*, 103(2): 209-217.
- Costa, S., Pinto, D., et al., 2008. XRCC1 Arg399Gln and RAD51 5'UTR G135C polymorphisms and their outcome in tumor aggressiveness and survival of Portuguese breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 109(1): 183-185.
- DeVos, L., Chanson, A., et al., 2008. Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine and DNA uracil concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition* 88: 1149-1158.
- Ding, Z., Yang, X., et al., 2000. Human papilloma virus type-16 immortalized endocervical cells selected for resistance to cisplatin are malignantly transformed and have a multidrug resistance phenotype. *International Journal of Cancer*, 87(6): 818–823.
- Doorbar, J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical

- cancer. *Clinical Science*, 110: 525-541.
- Hanahan, D., R. A. W., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Duarte, M. C., Colombo, J., et al., 2007. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in a Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3): 397-401.
- Duell, E. J. W., John K., et al., 2000. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells *Carcinogenesis*, 21(5): 965-971.
- Duthie, S. J., 1999. Folic acid deficiency and cancer: Mechanisms of DNA instability. *British Medical Bulletin*, 55(3): 578-592.
- Eichholzer, M., Lüthy, J., et al., 2001. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: The epidemiological evidence. *Swiss Medical Weekly* 131: 539 - 549.
- Elson, D. A., Riley, R. R., et al., 2008. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Research*, 60(5): 1267–1275.
- Esserman, L. and Thompson, I., 2010. Solving the overdiagnosis dilemma. *JNCI*, 102(9): 582-583.
- Fan, J., Otterlei, M., et al., 2004. XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic Acids Research*, 32(7): 2193-2201.
- Farkasova, T., Gurska, S., et al., 2008. Significance of amino-acid substitution variants of DNA repair genes in radiosusceptibility of cervical cancer patients; a pilot study. *Neoplasma*, 55(4): 330-337.
- Fauci, A. S., Braunwald, E., et al., 2008. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th Edn.: McGraw-Hill.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., et al., 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 7: 21-33.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., et al., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GloboCan 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12): 2893–2917.
- Fowler, B. M., Giuliano, A. R., et al., 1998. Hypomethylation in cervical tissue: Is there a correlation with folate status? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7: 901-906.
- Franco, E. L., Duarte-Franco, E., et al., 2001. Cervical cancer: Epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal* 164(7): 1017-1025.
- Gao, R., Price, D. K., et al., 2008. Ethnic disparities in Americans of European descent versus Americans of African descent related to polymorphic ERCC1, ERCC2, XRCC1, and PARP1. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(5).
- García-Closas, R., Castellsagué, X., et al., 2005. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. *International Journal of Cancer*,

- 117(4): 629–637.
- Ghodke, Y., Chopra, A., et al., 2011. Profiling single nucleotide polymorphisms across intracellular folate metabolic pathway in healthy Indians. *Indian Journal of Medical Research*, 133(3): 274-279.
- Ginecologia, S. P., 2007. Cancro ginecológico, reunião de consenso nacional. Coimbra.
- Giuliano, A. R., Papenfuss, M., et al., 1997. Antioxidant nutrients: Associations with persistent human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 6: 917-923.
- Goode, E. L., Ulrich, C. M., et al., 2002. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preview*, 11(12): 1513-1530.
- Gossage, L., Mohammed, M., et al., 2009. Clinical implications of DNA repair genetic alterations in cancer. *Magazine of european medical oncology*, 2: 15-19.
- Grm, H. S., Bergant, M., et al., 2009. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian Journal Medical Research*, 130: 277-285.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., et al., 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468.
- Han, J., Hankinson, S. E., et al., 2004. Genetic variation in XRCC1, sun exposure, and risk of skin cancer. *British Journal of Cancer*, 91: 1604-1609.
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., et al., 1988. *Epidemiology in medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Ho, J. W., 2006. Potential and cytotoxicity of cis-platinum complex with anti-tumor activity in combination therapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 1(1): 129-134.
- Horton, Julie K., , Watson, M., et al., 2008. XRCC1 and DNA Polymerase β in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Research*, 18(1): 48-63.
- Hu, J. J., Smith, T. R., et al., 2001. Amino-acid substitution variants in APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, 22(6): 917-922.
- Hu, Z., Ma, H., et al., 2005. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: A meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(7).
- Huang, Y., Li, L., et al., 2009. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: A meta-analysis. *Mutagenesis*, 24(4): 331-339.
- Janicek, M. F. and Averette, H. E., 2001. Cervical cancer: Prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 52(2): 92-114.
- Javier, R. T. and Butel, J. S., 2008. The history of tumor virology. *Cancer Research*, 68(19): 7693-7706.

7. Referências Bibliográficas

- Jeon, Y.-T., Kim, J. W., et al., 2005. DNA repair gene XRCC1 Arg399Gln polymorphism is associated with increased risk of uterine leiomyoma. *Human Reproduction* 20(6): 1586–1589.
- Jo, H. and Kim, J. W., 2005. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. In: *Cancer Therapy*. Seoul, Korea: pp: 419-434.
- Kawakami, K., Ooyama, A., et al., 2008. Low expression of Gamma-Glutamyl Hydrolase mRNA in primary colorectal cancer with the CpG island methylator phenotype. *British Journal of Cancer*, 98(9): 1555 – 1561.
- Kelada, S. N., Eaton, D. L., et al., 2003. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environmental Health Perspectives* 111: 1055-1064.
- Key, T.J., 2011. Fruit and vegetables and cancer risk. *British Journal of Cancer*, 104(1): 6-11.
- Koivusalo, R., Krausz, E., et al., 2002. Chemoradiation of cervical cancer cells: Targeting human papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer Research*, 62: 7364–7371.
- Kostova, I., 2006. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 1(1): 1-22.
- Krawczyk, E., Supryniewicz, F. A., et al., 2008. Koilocytosis - a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *The American Journal of Pathology*, 173(3): 682-688.
- Kumar, V., Abbas, A. K., et al., 2007. *Robbins basic pathology*. 8th Edn.: Elsevier.
- Kundu, S., Basu, S., et al., 2008. Chemoradiation in locally advanced cervical cancer: A randomized trial. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 29(4).
- Ladiges, W. C., 2006. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene*, 25: 1612-1619.
- Lamprecht, S. A. and Lipkin, M., 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: Molecular mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(8): 601-614.
- Lando, M., Holden, M., et al., 2009. Gene dosage, expression, and ontology analysis identifies driver genes in the carcinogenesis and chemoradioresistance of cervical cancer. *Plos Genetics*, 5(11).
- Le, W., Lockhart, C. A., et al., 2005. Cancer pharmacogenomics: Powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The Oncologist*, 10: 104-111.
- Ledwaba, T., Dlamini, Z., et al., 2004. Molecular genetics of human cervical cancer: Role of papillomavirus and the apoptotic cascade. *Biological Chemistry*, 385: 671-682.
- Lie, A. K. and Kristensen, G., 2008. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Reviews Molecular Diagnosis*,

- 8(4): 405-415.
- Lin, K., Doolan, K., et al., 2010. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Journal of Formosan Medical Association*, 109(1).
- Little, M. P., 2010. Cancer models, genomic instability and somatic cellular darwinian evolution. *Little Biology Direct*, 5(19): 1-19.
- Loktionov, A., 2004. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Letters*, 208: 1-33.
- Lunn, R. M., Langlois, R. G., et al., 1999. XRCC1 polymorphisms: Effects on aflatoxin b1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Research*, 59: 2557–2561.
- Marsin, S., Vidal, A. E., et al., 2003. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45): 44068–44074.
- Matos, A., Moutinho, J., et al., 2005. The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a Southern European population. *European Journal of Cancer Prevention*, 14(5): 485-491.
- Medeiros, R., Macedo Pinto, I., et al., 1997. High prevalence of HPV16 in low grade squamous intraepithelial lesions: A study in Northern Portugal. *Monduzzi Editore*.
- Medeiros, R., Prazeres H., et al., 2005. Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a Southern European population at high risk of cervical cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 14(5): 467-471.
- Mellor, H. R. and Callaghan, R., 2008. Resistance to chemotherapy in cancer: A complex and integrated cellular response. *Pharmacology*, 81(4): 275–300.
- Metsola, K., Kataja, V., et al., 2005. XRCC1 and XPD genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish case-control study. *Breast Cancer Research*, 7: 987-997.
- Meyskens, F. L. and Manetta, A., 1995. Prevention of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1417-1419.
- Michor, F., Iwasa, Y., et al., 2004. Dynamics of cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 4: 197-205
- National Academy of Sciences, F., 2010. Dietary reference intakes: Recommended intakes for individuals. United States Department of Agriculture, Food and Nutrition Information Center, Beltsville.
- Nogueira, A., Catarino, R., et al., 2009. Influence of DNA repair rad51 gene variants in overall survival of non-small cell lung cancer patients treated with first line chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66(3): 501-506.
- Odin, E., Wettergren, Y., et al., 2003. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clinical*

- Cancer Research, 9(16): 6012-6019.
- Organista-Navaa, J., Gómez-Gómez, Y., et al., 2010. Polymorphisms of the Gamma-Glutamyl Hydrolase gene and risk of relapse to acute lymphoblastic leukemia in Mexico. *Leukemia research*, 34: 728-732.
- Ottone, F., Miotti, S., et al., 1997. Relationship between folate-binding protein expression and cisplatin sensitivity in ovarian carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer*, 76(1): 77-82.
- Piyathilake, C. J., Henao, O. L., et al., 2004. Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Research*, 64(23): 8788–8793.
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., et al., 2007. Lower red blood cell folate enhances the HPV-16–associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*, 23: 203–210.
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., et al., 2009. Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prevention Research*, 2(7): 658-664.
- Pollard, C., Nitz, M., et al., 2009. Genoproteomic mining of urothelial cancer suggests Gamma-Glutamyl Hydrolase and Diazepam-Binding Inhibitor as putative urinary markers of outcome after chemotherapy. *The American Journal of Pathology*, 175(5): 1824-1830.
- Potischman, N., Brinton, L. A., et al., 1991. A case-control study of serum folate levels and invasive cervical cancer. *Cancer Research*, 51: 4785-4789.
- Potischman, N., 1993. Nutritional epidemiology of cervical neoplasia. *The Journal of Nutrition*.
- Powers, H. J., 2005. Interaction among folate, riboflavin, genotype, and cancer, with reference to colorectal and cervical cancer. *The Journal Of Nutrition*.
- Putral, L. N., Bywater, M. J., et al., 2005. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Molecular Pharmacology*, 68(5): 1311-1319.
- Rampersaud, G. C., Bailey, L. B., et al., 2002. Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: Review and recommendations for practitioners. *Journal of the American Dietetic Association* 102(9): 1273-1282.
- Rao, K. S., 2007. DNA repair defects and neurological disease: DNA repair pathways in mammalian cells. *Nature Clinical Practice Neurology*, 3(3): 167-172.
- Rhee, M. S., Lindau-Shepard, B., et al., 1998. Characterization of human cellular Gamma-Glutamyl Hydrolase. *Molecular Pharmacology*, 53: 1040–1046.
- Roden, R. and Wu, T.-C., 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nature Reviews Cancer* 6: 753-763.
- RORENO (2010) Registo oncológico regional do norte 2006. Instituto Português de

7. Referências Bibliográficas

- Oncologia do Porto, Porto
- Rose, P. G., Bundy, B. N., et al., 1999. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 340: 1144-1153.
- Saadat, M., Kohan, L., et al., 2009. Haplotype analysis of XRCC1 at codons 194 and 399 and breast cancer risk, a case-control study. *Comparative Clinical Pathology* 19(4): 345-349.
- Sadikovic, B., Al-Romaih, K., et al., 2008. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Current Genomics*, 9(6): 394-408.
- Santin, A. D., Hermonat, P. L., et al., 1998. Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma. *Cancer*, 83(11): 2346 - 2352.
- Saxena, A., Yashar, C., et al., 2005. Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192: 1399-1403.
- Schneider, E. and Ryan, T. J., 2006. Gamma-Glutamyl Hydrolase and drug resistance. *Clinica Chimica Acta*, 374: 25-32.
- Schwartz, S. M., Daling, J. R., et al., 2001. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: A population-based study. *Journal of Clinical Oncology*, 19(7): 1906-1915.
- Sedjo, R. L., Inserra, P., et al., 2002. Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 353-359.
- Serra-Majem, L., Ribas, L., et al., 2003. Nutrient adequacy and mediterranean diet in spanish school children and adolescents. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(1): 35-39.
- Shen, H., Xu, Y., et al., 2000. Polymorphisms of the DNA repair gene *xrcc1* and risk of gastric cancer in a chinese population. *International Journal of Cancer*, 88(4): 601-606.
- Shen, M.R., Zdzienicka, M. Z., et al., 1998. Mutations in hamster single-strand break repair gene *XRCC1* causing defective DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 26(4): 1032-1037.
- Siddik, Z. H., 2003. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22: 7265-7279.
- Skjelbred, C. F., Sæbø, M., et al., 2006. Polymorphisms of the *xrcc1*, *xrcc3* and *xpd* genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a norwegian cohort: A case control study. *BMC*, 6(67).
- Simopoulos, A. P., 2001. The mediterranean diets: What is so special about the diet of greece? The scientific evidence. *The Journal of Nutrition*, 113(11): 3065-3073.

7. Referências Bibliográficas

- Society, A. C. (2009) Cancer facts and figures 2009 Atlanta:American Cancer Society
- Sousa, H., Santos, A. M., et al., 2007. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(5): 731-741.
- Stanley, M., 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24(1): 16-22.
- Stanley, M. A., Pett, M. R., et al., 2007. HPV: From infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35(6): 1456-1460.
- Stanley, M., 2010. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infectious Agents and Cancer*, 5(19).
- Sterpone, S. and Cozzi, R., 2010. Influence of XRCC1 genetic polymorphisms on ionizing radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010.
- Tewari, K. S. and Monk, B. J., 2010. The rationale for the use of non-platinum chemotherapy doublets for metastatic and recurrent cervical carcinoma. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 8(2): 108-115.
- Van Gils, C. H., Bostick, R. M., et al., 2002. Differences in Base Excision Repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk. An example of polymorphisms in the XRCC1 gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11(11): 1279-1284.
- VanEenwyk, J., Davis, F. G., et al., 1992. Folate, vitamin C, and cervical Intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Volume 1: 119 -124.
- Weinstein, S. J., Ziegler, R. G., et al., 2001. Low serum and red blood cell folate are moderately, but nonsignificantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in U.S. Women. *The Journal of Nutrition*: 2040-2048.
- Wolf, J. K., Franco, E. L., et al., 2003. Innovations in understanding the biology of cervical cancer. *Cancer*, 98(9 Supplement): 2064-2069.
- Wood, R. D., Mitchell, M., et al., 2001. Human DNA repair genes. *Science*, 291(1284): 1284-1289.
- Woodman, C. B. J., Collins, S. I., et al., 2007. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7.
- Wu, M.-T., Chen, S.-Y., et al., 2003. No association between polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and cervical neoplasm risk. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 8: 100-103.
- Yao, R., Schneider, E., et al., 1996. Human Gamma-Glutamyl Hydrolase: Cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Biochemistry*, 93: 10134-10138.
- Yin, D., Galivan, J., et al., 2003. Characterization of the human Gamma-Glutamyl Hydrolase promoter and its gene expression in human tissues and cancer cell lines. *Gene*, 312: 281–288.

7. Referências Bibliográficas

- Yin, J., Rockenbauer, E., et al., 2002. Multiple single nucleotide polymorphisms on human chromosome 19q13.2–3 associate with risk of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 1449-1453.
- Yu, J. J. 2009. Unlocking the molecular mechanisms of DNA repair and platinum drug resistance in cancer chemotherapy. *Current Drug Therapy*, 4(1): 19-28.
- Ziegler, R. G., Weinstein, S. J., et al., 2002. Nutritional and genetic inefficiencies in one-carbon metabolism and cervical cancer risk. *The Journal of Nutrition*, 132: 2345S–2349S.
- Zur Hausen, H., Meinhof, W., et al., 1974. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International Journal of Cancer*, 13(5): 650-656.
- Zur Hausen, H., 2001. Viruses in human cancers. *Current Science*, 81(5): 523-527.

