MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA - TRABALHO FINAL

CAROLINA VICENTE DE CARVALHO MONTEIRO

Novos marcadores moleculares na estratificação do risco da infeção por HPV

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

Dr.^a TERESA REBELO

FEVEREIRO/2019

Novos marcadores moleculares na estratificação do risco da infeção por HPV

Autor: Carolina Vicente de Carvalho Monteiro Email: carolinavicentemonteiro@gmail.com

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Orientadora: Dr.ª Teresa Maria Rebelo Ferreira

Email: terebelo0@gmail.com

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Morada institucional:

Praceta Mota Pinto,

3000-075, Coimbra

Índice

1		Res	umc)	3
2		Abs	tract	t	5
3		List	a de	abreviaturas e siglas	7
4		Intro	oduç	ão	8
5		Mat	eriai	s e métodos	10
6 Vírus d		ıs do	o papiloma humano11		
7		Pre	venç	ão	14
	7.	1	Prev	venção primária	14
	7.	2	Pre	venção secundária	15
8		Resulta		dos	17
	8.	1	Dup	ola marcação imunocitoquímica p16/ki-67	17
		8.1.	1	Teste primário de rastreio	18
		8.1.	2	Estratificação do risco após deteção de HPV positiva	19
		8.1.	3	Estratificação do risco após citologia	20
	8.2	2	Dete	eção do mRNA das oncoproteínas E6 e E7 dos HPV de alto risco	21
		8.2.	1	Teste primário de rastreio	21
		8.2.	2	Estratificação do risco após deteção de HPV positiva	22
		8.2.	3	Estratificação do risco após citologia	22
	8.3	3	Met	ilação	24
	8.3. ²		1	Metilação do genoma viral	24
			2	Metilação do genoma do hospedeiro	25
	8.4	4	Micı	roRNAs	28
	8.	5	BIR	C5	30
	8.	6	TOF	P2A e MCM2	31
9		Disc	cuss	ão e conclusão	32
10)	Agradecimentos35			
11		Ref	erên	cias bibliográficas	36

1 Resumo

O cancro do colo do útero é uma das doenças oncológicas mais comuns em mulheres. A sua taxa de mortalidade é superior em países sem programa de rastreio bem definido, pelo que podemos concluir que o rastreio é essencial na redução da morbilidade e mortalidade deste cancro. Está também bem estabelecido que a infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV) se correlaciona com o cancro do colo do útero. No entanto, tendo em conta que a maioria das lesões por HPV regride e apenas algumas progridem para cancro, são necessários novos marcadores moleculares capazes de identificar infeções por HPV clinicamente relevantes e evitar referenciações para colposcopia desnecessárias. Os marcadores incluídos nesta revisão sistemática são a dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67, a deteção de mRNA das oncoproteínas E6/E7 dos HPV de alto risco, a deteção do grau de metilação do genoma viral e do genoma do hospedeiro, a deteção de microRNAs e a expressão das proteínas BIRC5, TOP2A e MCM2.

Foi realizada uma pesquisa através da base de dados *PubMed*, utilizando as palavraschave "papillomaviridae", "uterine cervical neoplasms", "RNA, messenger", "E6/E7", "cyclin dependent kinase inhibitor p16", "ki-67 antigen", "methylation", "microRNAs", "BIRC5 protein, human", "survivin", "DNA topoisomerases, type II" e "MCM2 protein, human", restrita ao período temporal de 2013 a 2018. Foram também consultados artigos presentes nas referências bibliográficas dos artigos primeiramente selecionados.

A dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67 mostra ser particularmente útil na estratificação do risco de cancro do colo do útero em mulheres HPV positivas ou após resultados citológicos de lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), atipia das células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) ou atipia das células escamosas de significado indeterminado, sem excluir lesão de alto grau (ASC-H). Tal acontece através do aumento da especificidade do rastreio do cancro do colo do útero. A deteção de mRNA das oncoproteínas E6/E7 dos HPV de alto risco leva também a um aumento da especificidade do rastreio. A deteção da metilação, por sua vez, mostra ser um bom método para diferenciar a gravidade das lesões. No entanto, é ainda necessário definir quais os melhores genes para o efeito e quais os métodos de quantificação da metilação mais adequados. A deteção da expressão diferencial de microRNAs parece também apresentar vantagens no rastreio de cancro do colo do útero, sendo necessário definir quais os microRNAs mais eficazes para o efeito. As proteínas BIRC5, TOP2A e MCM2 demonstram ser capazes de diferenciar as lesões, mas necessitam ainda de estudos que avaliem a sua eficácia em amostras mais significativas.

Em resumo, a dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67 e a deteção de mRNA das oncoproteínas E6/E7 dos HPV de alto risco são os novos marcadores moleculares mais

estudados, demonstrando benefícios no rastreio do cancro do colo do útero. Estes marcadores permitem a sinalização de lesões mais graves e com maior probabilidade de progressão e a diminuição das referenciações para colposcopia desnecessárias. A deteção do grau de metilação do genoma viral e do genoma do hospedeiro e a deteção de microRNAs também aparentam ser formas eficazes de detetar infeções por HPV clinicamente relevantes. É, no entanto, necessário definir quais os melhores genes e microRNAs para o efeito. Por último, as proteínas BIRC5, TOP2A e MCM2 são novos marcadores que também são bastante promissores e deverão ser alvo de futuros estudos.

Palavras-chave: papillomaviridae; cancro do colo do útero; RNA mensageiro; inibidor p16 de quinase dependente de ciclina; ki-67; metilação de DNA; microRNAs; BIRC5; DNA topoisomerases tipo II; MCM2.

2 Abstract

Cervical cancer is one of the most common oncologic diseases in women worldwide. Its mortality rates are higher in countries without a well-established mass screening program, therefore, screening is critical in reducing morbidity and mortality from this cancer. It is also known that human papillomavirus (HPV) infection is associated with cervical cancer. However, since most lesions caused by HPV regress and only some progress to cancer, new molecular markers able to identify clinically relevant HPV infection and avoid needless colposcopy referrals are still needed. The molecular markers included in this review are p16/ki-67 dual-stained cytology, E6/E7 mRNA detection, viral and host genome methylation assessment, microRNA detection and BIRC5, TOP2A and MCM2 expression.

A search was conducted in the PubMed database, using the keywords "papillomaviridae", "uterine cervical neoplasms", "RNA, messenger", "E6/E7", "cyclin dependent kinase inhibitor p16", "ki-67 antigen", "methylation", "microRNAs", "BIRC5 protein, human", "survivin", "DNA topoisomerases, type II" and "MCM2 protein, human", restricted from 2013 to 2018. Reference lists of relevant articles were also included.

P16/ki-67 dual-stained cytology is useful in cervical cancer risk stratification of HPV positive women and women with cytological results of low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and atypical squamous cells – possible HSIL (ASC-H). It provides better screening specificity. E6/E7 mRNA detection also provides an increase in screening specificity. Methylation assessment can determine the severity of lesions. It is still necessary, however, to define the best genes and methods to quantify methylation. MicroRNA detection seems to be useful in cervical cancer screening, but it is also needed to define the best microRNA targets. BIRC5, TOP2A and MCM2 expression appears to be related to lesion severity, but studies evaluating their efficacy in larger samples are still needed.

In conclusion, p16/ki-67 dual-stained cytology and E6/E7 mRNA detection are the most studied new molecular markers, with results showing they would be beneficial to screening. These markers detect the most severe lesions and those with the highest probability to progress and reduce needless colposcopy referrals. Assessment of methylation levels and detection of microRNAs also appear to be interesting ways to identify clinically relevant HPV infection. However, it is still necessary to define which genes and microRNAs have the highest diagnostic accuracy. Lastly, BIRC5, TOP2A and MCM2 proteins are novel targets that also show great promise and should be the focus of future studies.

Keywords: papillomaviridae; uterine cervical neoplasms; RNA, messenger; cyclin dependent kinase inhibitor p16; ki-67 antigen; methylation; microRNAs; BIRC5 protein, human; DNA topoisomerases, type II; MCM2 protein, human.

3 Lista de abreviaturas e siglas

ASC-H: atipia das células escamosas de significado indeterminado, sem excluir lesão de alto grau

ASC-US: atipia das células escamosas de significado indeterminado

CCU: cancro do colo do útero

CIN: neoplasia intraepitelial cervical

DGS: Direção Geral de Saúde

DNA: ácido desoxirribonucleico

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HPV: vírus do papiloma humano

HSIL: lesão escamosa intraepitelial de alto grau

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Cancro

LCR: long control region

LSIL: lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

miR: microRNA

NILM: negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna

OMS: Organização Mundial de Saúde

PNV: programa nacional de vacinação

RNA: ácido ribonucleico

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

4 Introdução

O cancro do colo do útero (CCU) é o quarto cancro mais frequente em mulheres e o segundo cancro ginecológico mais frequente a nível mundial, segundo os dados do projeto GLOBOCAN, da Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS).¹ Este projeto estima que o número total de novos casos de cancro do colo do útero em 2018 tenha sido de 569 847, e que a mortalidade tenha sido de 311 365 mulheres.¹ Em Portugal, a mortalidade, em 2015, foi de 201 mulheres, segundo o Programa Nacional Para as Doenças Oncológicas (2017), da Direção Geral de Saúde (DGS).² Tendo em conta estes valores, torna-se inquestionável a importância das medidas de prevenção do cancro do colo do útero. O seu benefício é constatado pelo facto de a mortalidade por este cancro ser superior nos países menos desenvolvidos, em que estas medidas não estão ainda bem estruturadas e disponibilizadas à população. ¹ Como tal, este trabalho é direcionado precisamente para a prevenção, mais particularmente para a prevenção secundária (rastreio) desta patologia.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é a infeção viral do trato reprodutivo mais frequente.³ A maioria dos indivíduos sexualmente ativos será infetada num dado momento da sua vida (podendo ocorrer reinfeções repetidas), mais frequentemente pouco tempo após o início da atividade sexual.³ Há uma relação bem estabelecida entre a infeção por HPV e a etiopatogenia do cancro do colo do útero, podendo ser considerado que esta é condição necessária para o desenvolvimento de CCU.⁵ Por este motivo, o rastreio baseia-se principalmente na deteção de HPV ou de lesões secundárias à infeção. É necessário, no entanto, ter em conta que o intervalo de tempo entre a infeção por HPV e a evolução para cancro invasivo é, habitualmente, longo (entre 15 a 20 anos em mulheres imunocompetentes e entre 5 a 10 anos em mulheres com diminuição da imunidade).³ Para além disso, a maioria das infeções regride alguns meses após a sua aquisição, ou seja, nem todas as infeções por HPV irão culminar em cancro do colo do útero.^{3, 4} Podemos, então, concluir que os referidos métodos não são suficientes para a globalidade dos casos.

Existe uma janela de oportunidade em que a deteção dos casos com maior potencial de progressão para cancro invasivo permitirá um seguimento mais adequado e apertado de cada mulher. Deveremos, também, evitar procedimentos desnecessários nos casos em que esse potencial é menor, diminuindo a iatrogenia e o desconforto impostos às mulheres saudáveis. Neste contexto, a ferramenta ideal para otimizar o rastreio do cancro do colo do útero seria um teste capaz de fazer essa distinção, maximizando os benefícios do rastreio e minimizando as possíveis consequências. O objetivo desta revisão sistemática é avaliar novos marcadores moleculares quando à sua capacidade para o fazer, nomeadamente a

dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67, a deteção do mRNA das oncoproteínas E6/E7 dos HPV de alto risco, a deteção do grau de metilação do genoma viral e do genoma do hospedeiro, a deteção de microRNAs e a expressão das proteínas BIRC5, TOP2A e MCM2.

5 Materiais e métodos

Foi realizada uma pesquisa na base de dados *PubMed*, utilizando as palavras-chave "papillomaviridae", "uterine cervical neoplasms", "RNA, messenger", "E6/E7", "cyclin dependent kinase inhibitor p16", "ki-67 antigen", "methylation", "microRNAs", "BIRC5 protein, human", "survivin", "DNA topoisomerases, type II" e "MCM2 protein, human". A pesquisa foi restrita à língua portuguesa e inglesa e ao período temporal de 2013 a 2018. Foram incluídos artigos científicos originais e artigos de revisão. Foram também consultados alguns artigos presentes nas referências bibliográficas dos artigos primeiramente selecionados.

A seleção de artigos foi efetuada através da leitura do *abstract* dos resultados obtidos, de forma a avaliar se eram compatíveis com o objetivo desta revisão sistemática. Foram excluídos artigos pelos seguintes critérios: referentes a outras neoplasias malignas associadas a infeção por HPV, abordagem ao CCU que não a estratificação do risco/rastreio (fisiopatologia, tratamento, deteção de metástases, entre outros), populações específicas (grávidas, doentes HIV positivas), amostras colhidas pela própria e métodos de deteção de CCU através da urina/sangue.

Foram incluídos 93 artigos e foram consultados 4 *websites*: da Organização Mundial de Saúde, do projeto GLOBOCAN, da Agência Internacional de Pesquisa em Cancro e do National Cancer Institute.

6 Vírus do papiloma humano

Os vírus do papiloma humano são vírus icosaédricos, sem envelope, compostos por DNA em dupla hélice e circular. ^{4,6} Contêm uma região não codificante de controlo ou LCR (*long control region*), responsável pela maior parte da regulação da replicação e transcrição do DNA viral. ^{4,6} Contêm, também, duas regiões codificantes: a região precoce/*early*, com os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que é expressa na fase inicial do ciclo de vida viral, e a região tardia/*late*, com os genes L1 e L2, que codificam as proteínas major (L1) e minor (L2) da cápside, e que é expressa numa fase posterior do ciclo de vida viral. ^{4,6}

O gene E1 codifica uma proteína com atividade de DNA helicase, que se liga ao local de origem da replicação viral e recruta os componentes celulares necessários para que esta ocorra. A proteína E2 faz o recrutamento da proteína E1 para o local de origem da replicação viral, regula a expressão de outros genes virais e é necessária para a transferência do DNA viral aquando da divisão das células do hospedeiro. A função da proteína E4 ainda não está definida, mas poderá ter um papel na amplificação do DNA viral e na libertação de partículas virais. As proteínas codificadas pelos genes E5, E6 e E7 são consideradas oncoproteínas. O mecanismo de ação da E5 também ainda não está definido, sendo que contribui para a amplificação do DNA viral, estando relacionada com a regulação de vias de fatores de crescimento e com a evasão ao sistema imune. As proteínas E6 e E7 têm como função garantir a replicação viral, tendo de contrariar os processos de apoptose celular. O principal alvo conhecido da proteína E6 de HPV oncogénicos é a proteína p53, supressora tumoral, provocando a sua destruição e impedindo que exerça o seu papel. A oncoproteína E7 tem como principal alvo a proteína pRb, também uma proteína supressora tumoral.

São conhecidos mais de 200 tipos de HPV, classificados em 5 diferentes géneros, alfa, beta, gama, mu e nu.^{6,7} Os tipos envolvidos na carcinogénese cervical estão incluídos no grupo alfa.⁶ Os HPV pertencentes a este género podem ser divididos em dois grupos: os de baixo risco e os de alto risco.^{4,7} Os de baixo risco estão associados principalmente a condilomas acuminados ano-genitais, nomeadamente os tipos 6 e 11, responsáveis por cerca de 90% destes casos.⁷ Os HPV de alto risco incluem os classificados pela IARC como carcinogénicos do grupo 1 ("carcinogénicos para humanos"), nomeadamente os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59.^{4,7,8} Podem estar associados a neoplasias malignas do colo do útero, da vagina, da vulva, do pénis, do ânus e da cabeça e pescoço.^{4,7} Os tipos 16 e 18 são os mais frequentemente responsáveis por CCU, sendo detetados em cerca de 70% dos casos.^{4,6,7}

A infeção por HPV é a infeção viral do trato reprodutivo mais frequente.^{3,7} A maioria dos indivíduos sexualmente ativos adquire infeção num dado momento da sua vida

(aproximadamente 80% das mulheres sexualmente ativas).^{3,4,6,7} Tal ocorre mais frequentemente pouco tempo após o início da atividade sexual, havendo um pico de incidência em adolescentes/jovens.^{3,4,6,7,9} Alguns fatores foram associados ao aumento do risco de infeção, nomeadamente a idade precoce de início da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais ou parceiro com múltiplos parceiros sexuais, a não utilização do preservativo, o tabagismo, a contraceção hormonal, o compromisso da imunidade e fatores genéticos.^{3,4,7} A principal forma de transmissão é o contacto sexual, podendo também ocorrer transmissão vertical e, possivelmente, transmissão por procedimentos médicos ou por objetos contaminados.⁶

É frequente que as infeções por HPV sejam totalmente assintomáticas e, a maior parte, regride nos primeiros 2 anos após aquisição, havendo apenas uma minoria que persiste, sendo este um pré-requisito para a evolução para carcinoma.^{3,6,7} O intervalo de tempo entre a infeção e a evolução para carcinoma é, habitualmente, longo: cerca de 15 a 20 anos em mulheres imunocompetentes e cerca de 5 a 10 anos em mulheres com compromisso da imunidade.^{3,7}

O HPV tem tropismo para o epitélio pavimentoso estratificado, infetando células da camada basal do epitélio pavimentoso estratificado cervical através de zonas de microtraumatismos, sendo que, neste caso, o local de infeção mais frequente é a zona de transformação. ^{6,10} O ciclo de vida do HPV está representado na figura 1. ¹¹ Uma vez presente na camada basal, inicia a fase não-produtiva, em que o genoma viral está presente em pequena quantidade, na forma episomal e depende da célula hospedeira para a sua replicação, sendo apenas expressos os genes da fase precoce. ^{6,10} Após esta fase, ocorre a manutenção do estado não-produtivo, em que o genoma viral se mantém ao longo de sucessivas divisões da célula hospedeira, sendo este processo ainda pouco compreendido. ⁶ Eventualmente, poderá entrar na fase produtiva, quando as células filhas iniciam a diferenciação, atrasando esse processo e redirecionando a capacidade replicativa da célula para a amplificação viral. ⁶ Tal acontece devido à ação das oncoproteínas E6 e E7, que estimulam a progressão do ciclo celular, inibem a apoptose e levam à destruição de proteínas supressoras tumorais. ¹⁰ É nesta fase que são expressos os genes tardios, que codificam as proteínas da cápside, havendo produção e libertação viral. ⁶

A integração do genoma viral no genoma do hospedeiro é um evento relevante na progressão para CCU, levando ao aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7 que, como já referido, têm um papel importante na carcinogénese. Esse aumento de expressão ocorre devido à disrupção da proteína E2 aquando da integração do genoma viral, uma vez que esta proteína regula negativamente a expressão das proteínas E6 e E7. Sabe-se, no entanto, que a integração não ocorre em todos os casos de carcinoma.

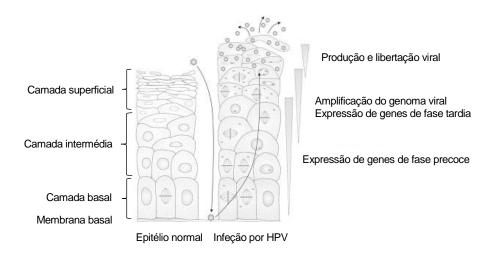


Figura 1 – Ciclo de vida do HPV (Adaptado de Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. Front Microbiol. 2012;3:152.).

7 Prevenção

Quanto à prevenção do cancro do colo do útero, podemos considerar a prevenção primária (vacinação) e a prevenção secundária (rastreio). Há ainda algumas medidas gerais que fazem parte desta prevenção, como a educação sexual dos jovens, fornecendo informação sobre atividade sexual segura e fatores de risco para infeção por HPV. Alguns desses fatores são a idade precoce da primeira relação sexual, os múltiplos parceiros sexuais ou um parceiro com múltiplos parceiros sexuais, a não utilização do preservativo, a contraceção hormonal, o compromisso da imunidade e o tabagismo.^{3,7}

7.1 Prevenção primária

Quanto à prevenção primária, a vacinação contra o HPV, para raparigas, é recomendada pela OMS.³ Em Portugal, esta vacina está contemplada no Programa Nacional de Vacinação (PNV) desde 2008, ano em que foi introduzida a vacina tetravalente (genótipos 6, 11, 16, 18), para as jovens com 13 anos de idade.⁹ Em 2017, foi substituída pela vacina nonavalente (genótipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58), que protege contra cerca de 90% dos genótipos associados a CCU.⁹

O objetivo da vacinação é a prevenção de lesões pré-cancerosas, neoplasias malignas e condilomas acuminados associados aos genótipos contidos nas vacinas.⁹ Múltiplos estudos concluem que a sua eficácia é muito elevada, chegando mesmo a considerar que a vacina nonavalente pode prevenir cerca de 90% dos casos de cancro do colo do útero.^{9,13,14} É de salientar que esta eficácia é superior quando a vacinação ocorre antes do início da atividade sexual.³

Segundo as normas da DGS, a vacina nonavalente pode ser administrada a partir dos 9 anos de idade, inclusivamente.¹³ O esquema vacinal recomendado é, aos 10 anos, fazer a primeira dose e, 6 meses depois, a segunda.¹³ Caso a vacinação seja iniciada até aos 15 anos de idade, o esquema será o mesmo, mas, caso apenas se inicie a partir dos 15 anos, inclusivamente, deverá ser realizado um esquema de 3 doses.¹³

Considerando a última análise do PNV realizada pela DGS, as coortes que iniciaram a vacinação entre 2013 e 2016 obtiveram uma cobertura vacinal superior a 85% para a 1.ª dose da vacina. ¹⁵ Quase todas obtiveram o mesmo resultado para a 2.ª dose, excetuando a coorte de 2006, que apenas atingiu os 77%. ¹⁵ O valor de 85% mantém-se como a meta estabelecida para a cobertura vacinal contra o HPV, estando esse valor a ser, portanto, cumprido. ¹⁵ A cobertura vacinal a nível mundial é muito variável.

7.2 Prevenção secundária

Relativamente à prevenção secundária (rastreio), os métodos mais frequentemente utilizados são a citologia e o teste de HPV.¹⁶

Quanto à citologia, existem dois métodos para a realizar: convencional ou em meio líquido. Este último facilita a leitura das amostras e possibilita a realização de outros testes, como a deteção de HPV. A citologia em meio líquido tem sido cada vez mais aceite, sendo o método citológico utilizado em praticamente todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática. Apesar de ser amplamente utilizada, a citologia tem a desvantagem de ser um método subjetivo, dependente do observador e, consequentemente, pouco reprodutível. Por esse motivo, os estudos que avaliam a sua sensibilidade e especificidade obtêm resultados díspares.

As amostras citológicas são classificadas segundo o sistema de Bethesda. Este sistema implica, em primeiro lugar, a avaliação da amostra e, em segundo lugar, a sua classificação geral. Segundo lugar, a sua classificação geral.

Quanto à avaliação da amostra, é necessário referir a presença/ausência dos três tipos de células do colo do útero (do endocolo, da zona de transformação e do exocolo), assim como de fatores que diminuam a qualidade da amostra, como, por exemplo, a presença de sangue ou inflamação. 18,19

Quanto à classificação geral, existem as categorias: "negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna" (NILM), "anomalias das células epiteliais", "sem evidência de lesão intraepitelial, mas com presença de células endometriais", e "outra neoplasia maligna". 18,19 A categoria de anomalias das células epiteliais divide-se em dois grupos: células escamosas e células glandulares. 18,19 Dentro do grupo de anomalias das células escamosas, existem as seguintes classificações: "atipia das células escamosas de significado indeterminado" (ASC-US), "atipia das células escamosas de significado indeterminado, sem excluir lesão de alto grau" (ASC-H), "lesão escamosa intraepitelial de baixo grau" (LSIL), "lesão escamosa intraepitelial de alto grau" (HSIL) e carcinoma espinho-celular. 18,19 Dentro do grupo de anomalias das células glandulares, existem as seguintes classificações: "células glandulares atípicas" (AGC), "células glandulares atípicas favorecendo neoplasia", "adenocarcinoma *in situ*" (AIS) e "adenocarcinoma". 18,19

O teste de HPV é também realizado no rastreio do CCU, uma vez que a infeção por HPV é necessária para o desenvolvimento desta patologia. ^{5,16} Este teste mostra uma sensibilidade superior à da citologia, com um valor preditivo negativo muito elevado, apesar de a especificidade ser menor que a da citologia. ^{16,17} Tem também a vantagem de ser um método objetivo e reprodutível, caraterísticas relevantes num teste de rastreio. ¹⁶

Por outro lado, este teste não diferencia infeções transitórias de infeções persistentes, sendo que, como já referido, a maioria das infeções não leva a progressão para CCU.^{3,7,17} Tal é particularmente problemático em mulheres jovens, com maior prevalência de infeção por HPV mas maior probabilidade de resolução espontânea.^{16,20} Esta desvantagem do teste de HPV poderá traduzir-se num número excessivo de referenciações para colposcopia desnecessárias, levando a um aumento dos custos e da iatrogenia do rastreio do CCU.²⁰

Por este motivo, são necessários testes adicionais, capazes de selecionar as mulheres que, efetivamente, têm indicação para colposcopia.¹⁶

8 Resultados

8.1 Dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67

A proteína p16 é uma inibidora das quinases dependentes de ciclinas 4 e 6 (CDK4 e CDK6), estando o seu mecanismo de ação representado na figura 2. Em células normais, a proteína retinoblastoma (pRb) liga-se ao fator de transcrição E2F, impedindo que este promova a progressão do ciclo celular para a fase S. A fosforilação da pRb, mediada pela CDK 4 e 6, leva à libertação do E2F e à ativação do ciclo celular. A p16, ao inibir as referidas quinases, regula negativamente o ciclo celular. Nos carcinomas relacionados com o HPV, a oncoproteína E7 desregula a ligação pRb-E2F, levando à progressão do ciclo celular e a um consequente aumento da expressão da proteína p16.²¹⁻²³

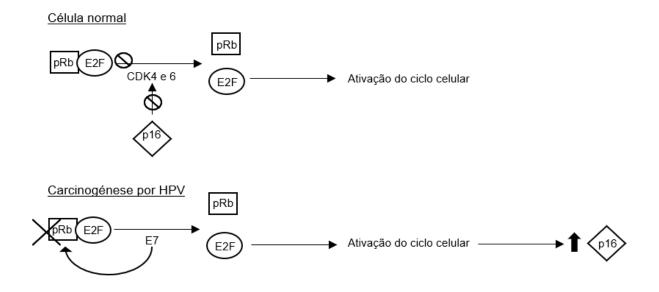


Figura 2 – Efeito do HPV na expressão da proteína p16.

A proteína ki-67 funciona como um marcador da proliferação celular.^{21, 23} Está presente apenas no núcleo de células em fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 ou M), não estando presente caso as células se encontrem em G0.^{21,23}

Assim, a presença destas proteínas na mesma célula assinala uma desregulação do ciclo celular, podendo funcionar como um marcador da persistência de infeções por HPV, da sua maior probabilidade de progressão e da gravidade das lesões secundárias à infeção (uma vez que a sua expressão é maior quanto mais graves as lesões), motivo pela qual é sugerida a sua utilidade no rastreio do CCU.²¹⁻²³

Existem vários estudos com o objetivo de comprovar e comparar a eficácia da dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67 com outros métodos de rastreio. Estes estudos apresentam elevada uniformidade relativamente ao teste utilizado (CINtec® PLUS, contendo anticorpos anti-p16 e anti-ki-67) e à classificação de uma amostra como positiva (quando pelo menos uma célula apresenta, simultaneamente, coloração vermelha no núcleo – ki-67 – e coloração castanha no citoplasma – p16). É, assim, eliminada uma possível fonte de variabilidade dos resultados.²² Para além disso, uma grande vantagem deste método é a sua objetividade, que resulta numa maior reprodutibilidade dos resultados, havendo elevada concordância entre diferentes observadores.^{22,24} Permite, também, que a sua eficácia seja menos dependente do observador, podendo ser realizado de forma mais fiável em meios com técnicos menos treinados.^{22,24}

Há, em geral, três contextos em que é avaliada a utilidade da dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67: como teste primário de rastreio, para estratificação do risco de CCU das mulheres HPV positivas e para estratificação do risco de CCU após citologia.

8.1.1 Teste primário de rastreio

Quanto à avaliação deste método como possível teste primário de rastreio, foi realizado o estudo PALMS (*Primary ASC-US and LSIL Marker Study*), que incluiu centros de cinco diferentes países da Europa.²⁵ Os resultados deste estudo apontaram para, ao comparar a dupla marcação imunocitoquímica com a citologia, uma maior sensibilidade e uma especificidade semelhante.²⁵ Ao ser comparada com a deteção de HPV, foi demonstrada uma maior especificidade e uma menor sensibilidade, sendo que a dupla marcação imunocitoquímica contribuiu para uma redução de quase 50% do número de falsos positivos e uma diminuição do número de mulheres referenciadas para colposcopia.²⁵ Este método parece, então, ser especialmente atrativo como estratégia de rastreio em mulheres com idade inferior a 30 anos, em que a infeção por HPV é bastante frequente e a especificidade do teste de deteção de HPV é baixa.²⁵

Alguns estudos obtiveram resultados diferentes dos do PALMS, tendo sido concluído que a dupla marcação imunocitoquímica tem sensibilidade semelhante, mas maior especificidade que a citologia. ^{23,26} Tal pode ter ocorrido devido à elevada variabilidade da sensibilidade e especificidade da citologia, pelo facto de ser um método subjetivo e dependente da experiência do técnico que a realiza, devido aos diferentes métodos citológicos utilizados e devido ao facto de, quando os técnicos sabem previamente se há ou não presença de HPV, a sensibilidade da citologia tender a aumentar e a especificidade a diminuir (informação que nem sempre está expressa nos artigos). ^{23,26} É importante referir que a amostra destes estudos é bastante inferior à do estudo PALMS. ^{23,26}

Quanto à comparação com a deteção de HPV, Prigenzi *et al.* (2018) concluíram também que a dupla marcação obtém uma maior especificidade e valor preditivo positivo, confirmando a diminuição das referenciações para colposcopia, e uma menor sensibilidade e valor preditivo negativo.²⁷ Yu *et al.* (2016), por outro lado, referiram uma sensibilidade semelhante entre os dois testes, tendo a dupla marcação imunocitoquímica uma especificidade semelhante para a deteção de CIN2+ e uma maior especificidade para a deteção de CIN3+.²⁶

8.1.2 Estratificação do risco após deteção de HPV positiva

Existem vários estudos relativamente à utilidade da dupla marcação imunocitoquímica para estratificação das mulheres HPV positivas. O teste HPV positivo não distingue as infeções transitórias das infeções persistentes, levando a uma elevada referenciação para colposcopia independentemente do risco de progressão das infeções. A estratificação desse risco torna-se, então, imprescindível, não só para minimizar o impacto negativo de procedimentos invasivos desnecessários na mulher, como para diminuir os custos relativos ao rastreio de CCU.²⁸

Estudos que compararam a utilidade da dupla marcação imunocitoquímica com a da citologia para a estratificação do risco de CCU de mulheres HPV positivas concluíram que a dupla marcação apresenta sensibilidade semelhante e maior especificidade e VPP. ^{29,30} Num desses estudos, as citologias foram realizadas num centro que apresenta elevada sensibilidade, e, em ambos, os técnicos tinham conhecimento do resultado da deteção do HPV, pelo que a verdadeira vantagem deste novo teste pode ser ainda maior que o estimado. ^{29,30} No entanto, um outro estudo concluiu que a dupla marcação apresenta maior sensibilidade, VPP e VPN, mas especificidade semelhante à da citologia. Outros investigadores concluíram ainda que apresenta maior sensibilidade e menor especificidade que a citologia, facto que pode ser devido aos motivos já referidos. ^{28,31,32}

Ao comparar a dupla marcação imunocitoquímica com a genotipagem 16/18, Ebisch *et al.* (2017), concluíram que a primeira apresenta maior sensibilidade e menor especificidade para a deteção de lesões, resultando num número inferior de falsos negativos.³⁰ Foi também demonstrado por Wright *et al.* (2016) que, numa população positiva para HPV de alto risco, a forma de obter maior sensibilidade e VPN seria através da realização, em primeiro lugar, de genotipagem 16/18. No caso de um resultado positivo, deveria ser feita referenciação para colposcopia. No caso de um resultado negativo, deveria ser feita estratificação do risco de CCU através da dupla marcação imunocitoquímica.³¹ Assim, a dupla marcação imunocitoquímica permite a estratificação do risco de CCU nos casos HPV positivos devido

aos restantes genótipos de alto risco.³¹ Apesar disso, a especificidade seria menor que a da dupla marcação ou da citologia isoladas.³¹

Há também estudos que avaliam a utilidade da dupla marcação imunocitoquímica em mulheres HPV positivas com citologia normal. Relativamente a estratégias que levam a repetição do teste de HPV e da citologia após um determinado período de tempo (inferior ao rastreio normal), há a vantagem de não se perder mulheres durante o *follow up*.³³ Uijterwaal *et al.* (2014) concluíram que esta estratégia permite uma deteção de aproximadamente 70% das lesões CIN3 neste grupo de mulheres.³³ Resulta ainda numa diminuição significativa do risco cumulativo de CIN3 a 5 anos relativamente a um resultado de HPV positivo e citologia normal isoladamente.³³

8.1.3 Estratificação do risco após citologia

Nas classificações intermédias da citologia (LSIL, ASC-US, ASC-H), apenas uma pequena percentagem de mulheres tem lesões de alto grau, pelo que a dupla marcação imunocitoquímica pode ser um bom marcador para estratificar esse risco. ^{34,35} O seu valor foi avaliado no caso de LSIL, LSIL ou ASC-US, e LSIL, ASC-US ou ASC-H.

No primeiro caso, os estudos mostraram que o uso concomitante da dupla marcação aumenta a especificidade e o VPP relativamente a citologia isolada, apresentando também um elevado VPN.³⁶ Esta estratégia demonstra ser útil para identificar as mulheres com menor risco de lesões de alto grau.³⁶

No caso de LSIL, ASC-US e ASC-H, foi concluído que a dupla marcação, relativamente à deteção de HPV, apresenta semelhante sensibilidade e maior especificidade, com a vantagem de diminuir o número de mulheres referenciadas para colposcopia. A4,37 Para além disso, num desses estudos, não houve desenvolvimento de lesões CIN3+ nos 9 anos seguintes em mulheres com dupla marcação imunocitoquímica negativa. A No entanto, o risco cumulativo de CIN2+ a 5 anos foi maior em mulheres com LSIL/ASC-US/ASC-H e dupla marcação negativa do que em mulheres com os mesmos resultados de citologia e HPV negativo, sendo recomendada nova avaliação 2 anos depois. Noutro estudo, mostrou-se ainda que tanto a sensibilidade como a especificidade da dupla marcação imunocitoquímica para deteção de CIN2+, após um resultado de LSIL ou ASC-US, são superiores às da deteção de CIN2+ com o teste de HPV.

8.2 Deteção do mRNA das oncoproteínas E6 e E7 dos HPV de alto risco

As proteínas E6 e E7 dos HPV oncogénicos têm um papel fulcral na carcinogénese cervical, já descrito anteriormente. A oncoproteína E6 tem como alvo a proteína supressora tumoral p53, enquanto a oncoproteína E7 tem como alvo a proteína supressora tumoral pRb. São, portanto, essenciais para a transformação maligna das células cervicais. Assim, o aumento da sua expressão pode traduzir lesões mais graves ou infeções persistentes por HPV com maior risco de progressão para lesões de alto grau e carcinoma. Por este motivo, a deteção do mRNA destas proteínas poderá ser utilizada como marcador no rastreio do CCU. Rocardo entre a deteção de mRNA E6/E7 e a gravidade das lesões já foi, inclusivamente, demonstrada em alguns estudos. Rocardo este su proteínas poderás estudos.

Este teste também é avaliado em três contextos, tal como a dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67: como teste primário de rastreio, para estratificação do risco das mulheres HPV positivas e para estratificação do risco após citologia.

8.2.1 Teste primário de rastreio

Estudos relativos à eficácia da deteção de mRNA E6/E7 como estratégia primária do rastreio avaliam principalmente a sua utilidade comparativamente ao teste de deteção de HPV. O teste HPV apenas traduz infeção, não discriminando infeções transitórias de infeções persistentes tendo, portanto, baixa especificidade. ^{39,41,42,44} A deteção de mRNA E6/E7, por sua vez, traduz o potencial oncogénico das infeções, ou seja, quais as infeções por HPV com maior risco de transformação maligna, podendo ultrapassar essa dificuldade. ^{38,40-42} Essa vantagem será particularmente relevante em mulheres mais jovens, devido à elevada prevalência de infeção por HPV, mas menor probabilidade de transformação maligna. ^{39,41}

Maior parte dos estudos mostrou, efetivamente, que a deteção de mRNA E6/E7 tem maior especificidade e VPP que a deteção de HPV, mas menor sensibilidade. ^{38,41,42,45} Em alguns dos estudos, a diferença na sensibilidade é, provavelmente, devido ao menor número de genótipos de HPV abrangidos pelos testes de deteção de mRNA. ⁴¹ Caso esse número fosse semelhante, a sensibilidade entre os dois testes não apresentaria diferenças significativas. ⁴¹ Efetivamente, Basu *et al.* (2016), através de um teste para deteção de mRNA mais abrangente, concluíram que a sensibilidade dos dois métodos é equivalente. ⁴⁰ Para além disso, a negatividade do mRNA E6/E7 em lesões que, posteriormente, foram histologicamente confirmadas como CIN2+, poderá dever-se ao facto de algumas lesões terem maior probabilidade de regressão, algo que é difícil de confirmar. ³⁹ Ainda assim, será

necessária uma melhor avaliação da sensibilidade deste teste, de forma a garantir que não serão perdidos casos de lesão de alto grau evolutiva.³⁹

A maior especificidade da deteção de mRNA E6/E7 leva a uma diminuição das referenciações desnecessárias para colposcopia, diminuindo a possibilidade de iatrogenia como consequência do rastreio.^{39,41}

8.2.2 Estratificação do risco após deteção de HPV positiva

Como já referido anteriormente, a deteção de HPV tem baixa especificidade, não permitindo distinguir infeções transitórias de infeções persistentes podendo levar a um elevado número de colposcopias desnecessárias. Assim, torna-se relevante a existência de marcadores que permitam a estratificação do risco após um resultado positivo na deteção de HPV, sinalizando as infeções com maior probabilidade de transformação maligna, nomeadamente a deteção de mRNA E6/E7.

Yao *et al.* (2017) concluíram que a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da deteção de mRNA e da citologia, numa população HPV positiva, não apresentam diferenças significativas.⁴⁷ No entanto, a citologia é muito dependente do observador, enquanto a deteção de mRNA tem a vantagem de ser um método mais objetivo e reprodutível sendo, por isso, um melhor teste de rastreio.⁴⁷

8.2.3 Estratificação do risco após citologia

Zappacosta *et al.* (2015) investigaram a utilidade da deteção de mRNA para estratificação do risco no caso de citologia com LSIL ou ASC-US, uma vez que estas lesões apresentam baixo VPP.⁴⁸ Demonstraram que, relativamente à deteção de HPV, este teste apresenta maior especificidade e quase o dobro do VPP.⁴⁸ Por outro lado, apresenta menor sensibilidade e VPN.⁴⁸ No entanto, o teste utilizado apenas deteta mRNA de cinco genótipos oncogénicos de HPV, pelo que, como já referido, pode ser esse o motivo da menor sensibilidade.⁴⁸ Para além disso, através da deteção de mRNA das proteínas E6/E7, foi demonstrada uma significativa redução das referenciações para colposcopia.⁴⁸

O estudo CLEAR (*the Clinical Evaluation of Aptima mRNA study*) foi um estudo multicêntrico, realizado nos Estados Unidos. ^{44,49} Avaliou a utilidade da deteção de mRNA através do teste APTIMA[®] e foi dividido em duas vertentes. ^{44,49} Na primeira vertente, foi avaliada a sua eficácia na estratificação do risco de mulheres com resultado de ASC-US na citologia, em comparação com a eficácia da deteção de HPV. ⁴⁹ Foi concluído que a deteção de mRNA apresenta semelhante sensibilidade e maior especificidade que a deteção de

HPV, e que, tal como referido no estudo anterior, há uma significativa diminuição das referenciações para colposcopia.⁴⁹

A segunda vertente do estudo CLEAR avaliou a eficácia da deteção de mRNA E6/E7 na estratificação do risco de mulheres com citologia prévia, com resultado de NILM.⁴⁴ Foi demonstrado que este teste apresenta, relativamente à deteção de HPV, semelhante sensibilidade e maior especificidade.⁴⁴ Em mulheres com resultado positivo na deteção de mRNA, o risco de desenvolver CIN2+ nos 3 anos seguintes foi cerca de 24 vezes superior ao das mulheres com resultado negativo.⁴⁴ Para além disso, no caso de um resultado negativo, o risco de CIN2+ nos 3 anos seguintes foi muito baixo.⁴⁴ Assim, é concluído neste estudo que a deteção de mRNA é um bom teste para adicionar a estratégias de rastreio baseadas na citologia.⁴⁴

8.3 Metilação

Estudos têm demonstrado que, na carcinogénese, estão envolvidas não só alterações genéticas, mas também alterações epigenéticas que contribuem para a progressão da doença, sendo que estas também ocorrem no CCU. 50-52 Assim, a avaliação da metilação do DNA, tanto do genoma do HPV como do hospedeiro, tem sido proposta como uma nova forma de diagnosticar e estratificar o risco de progressão de lesões pelo HPV. 50-52 O padrão de metilação do DNA depende da remoção ou adição de grupos metil à citosina dos dinucleótidos CpG, pelas DNA metiltransferases, regulando a expressão genética. 50,51 Outros locais também podem ser metilados, embora seja menos frequente. 50-52 A alteração da metilação parece contribuir para a progressão das lesões cervicais, provocando instabilidade genómica, inativação de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes. 50-52

8.3.1 Metilação do genoma viral

Pensa-se que a metilação do genoma viral ocorra através de um mecanismo de tentativa de defesa do hospedeiro, através de uma estratégia viral de forma a manter a infeção ao longo do tempo, ou ambos.⁵²

Vários estudos mostraram que o grau de metilação do gene L1 do HPV16 se correlaciona significativamente com a gravidade das lesões. 52-60

Niyazi *et al.* (2015) demonstraram que o maior grau de metilação e o maior número de dinucleótidos CpG metilados se correlacionam significativamente com CIN2+, sendo que o dinucleótido CpG com maior poder de discriminação é o da posição 6650.⁵³ Para além disso, o aumento da metilação está também relacionado com uma maior probabilidade de se tratar de uma infeção por HPV persistente, sendo que o dinucleótido que melhor distingue a duração das lesões é o da posição 6389.⁵³ Noutros estudos, os dinucleótidos das posições 5600 e 5609 mostraram também uma significativa correlação com a gravidade das lesões.^{54,61}

Apesar da maioria dos estudos se focar no HPV16, alguns testaram a utilidade da metilação do gene L1 de vários HPV (HPV18, 31, 33, 45, 51), demonstrando também que o grau de metilação se correlaciona significativamente com a gravidade das lesões. 52,56,59,62,63

Foi comparada a eficácia da deteção do grau de metilação do gene L1 do HPV16 com a da deteção de mRNA E6/E7, em amostras HPV16 positivas, tendo sido concluído que a deteção de mRNA apresenta maior sensibilidade e VPN, enquanto a deteção do grau de metilação apresenta maior especificidade e VPP.⁵⁵

Há também estudos que mostram que o grau de metilação do gene L2 de vários HPV oncogénicos (HPV16, 18, 31, 33, 45) está significativamente relacionado com a gravidade das lesões. 56-58,60,63

Kalantari *et al.* (2014) afirmaram que a deteção do grau de metilação de L1 e L2 é um teste com boa sensibilidade e especificidade no rastreio do CCU.⁵⁶

Contrariamente aos resultados anteriormente apresentados, Bryant *et al.* (2015), após avaliarem a eficácia da deteção do grau de metilação de L1 e L2 do HPV16 numa amostra de mulheres entre os 20 e os 22 anos de idade, concluíram que o grau de metilação não está significativamente relacionado com a gravidade das lesões em mulheres jovens. ⁶¹ No entanto, esse resultado pode ser devido ao facto de as lesões em mulheres mais jovens terem maior tendência a regredir. ⁶¹

O grau de metilação do gene E2 e do gene E5 do HPV16 também se relaciona significativamente com a gravidade das lesões.^{57,60} Por outro lado, o grau de metilação do gene E6 de HPV de alto risco parece não apresentar diferenças estatisticamente significativas consoante a gravidade das lesões.^{57,58,63}

Brandsma *et al.* (2014) avaliaram a utilidade de um teste composto pela deteção do grau de metilação de vários dinucleótidos CpG dos genes L1, L2 e E5 do HPV16, tendo concluído que este se relaciona significativamente com a gravidade das lesões e que seria um teste eficaz no rastreio do CCU.⁶⁰

8.3.2 Metilação do genoma do hospedeiro

Vários estudos investigaram a eficácia da deteção do grau de metilação de múltiplos genes do hospedeiro no rastreio do CCU, sendo a maioria supressores tumorais.^{50,64}

A metilação do gene FAM19A4 relaciona-se significativamente com a gravidade e com a duração das lesões, sendo um possível marcador a utilizar no rastreio de CCU.⁶⁵ Este teste parece detetar lesões mais avançadas e com maior probabilidade de progressão, e apresenta boa sensibilidade e especificidade na estratificação do risco de CCU em mulheres HPV positivas.⁶⁵ Outro estudo mostrou, no entanto, que a deteção do grau de metilação deste gene, nesta população, apresenta maior especificidade, mas menor sensibilidade que a citologia.⁶⁶

Kim *et al.* (2016) demonstraram que o grau de metilação dos genes CADM1, MAL, PAX1, e ADCYAP1 está significativamente relacionado com a gravidade das lesões, facto que foi também observado por outros investigadores.⁶⁷⁻⁷¹

Outros estudos mostraram que, através da deteção do grau de metilação dos genes CADM1 e MAL, são detetadas lesões mais avançadas que as detetadas pela citologia. ^{68, 69}

A combinação da citologia com a deteção da metilação destes genes, para estratificação de uma população HPV positiva, apresenta maior sensibilidade que qualquer um dos testes isoladamente, mas menor especificidade. ^{68,69} Neste caso, seria detetado um maior número de lesões CIN3 e carcinoma, à custa do aumento das referenciações para colposcopia. ^{68,69}

Quanto ao gene PAX1, foi avaliada a sua eficácia na estratificação do risco após citologia com resultado ASC-US, tendo demonstrado superior sensibilidade e especificidade que a deteção de HPV de alto risco, levando a uma diminuição das referenciações para colposcopia.⁷¹ Na estratificação do risco após citologia com resultado ASC-H, resultados semelhantes foram observados.⁷⁰

Foi também demonstrado que o grau de metilação dos genes CCNA1 e HS3ST2 aumenta progressivamente com a gravidade das lesões, levando a elevada sensibilidade e especificidade no rastreio de CCU, sendo a sensibilidade maior com a deteção combinada dos dois genes.^{72,73} Para além disso, foi ainda concluído que a deteção da metilação do gene CCNA1 apresentaria menor sensibilidade, mas maior especificidade que a deteção de HPV de alto risco.⁷²

Yin *et al.* (2015) concluíram que o grau de metilação do gene JAM3 se correlaciona significativamente com a gravidade das lesões.⁷⁴ Comparativamente à deteção de HPV, este teste apresenta menor sensibilidade e maior especificidade e VPP na estratificação das mulheres após um resultado citológico de LSIL ou ASC-US.⁷⁴ Em mulheres HPV positivas, a deteção do grau de metilação do gene JAM3 apresenta também menor sensibilidade e maior especificidade e VPP que a citologia.⁷⁴

Foi também investigada a utilidade da deteção do grau de metilação dos genes DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 e ZNF671, tendo o gene ZNF671 demonstrado a maior capacidade de deteção de lesões mais graves. ⁷⁵ Considerando um teste positivo perante a presença de metilação em pelo menos dois destes cinco genes, este método apresenta elevada sensibilidade e especificidade no rastreio do CCU. ⁷⁵ Schmitz *et al.* (2017) investigaram os cinco genes previamente referidos e ainda o gene ASTN1, tendo novamente o gene ZNF671 demonstrado a mesma capacidade. ⁷⁶ O teste baseado nestes seis genes apresenta elevada especificidade. ⁷⁶

Rogeri *et al.* (2018) demonstraram a metilação diferencial dos genes SOX1, TERT, LMX1A e do miR-124 consoante a gravidade das lesões.⁷⁷ Segundo este estudo, a deteção do grau de metilação dos genes SOX1, TERT e LMX1A apresenta menor sensibilidade, mas maior especificidade que a deteção de HPV.⁷⁷ A deteção do grau de metilação do miR-124, por sua vez, apresenta sensibilidade semelhante e maior especificidade relativamente à deteção de HPV.⁷⁷ Outros estudos mostraram também a metilação diferencial do gene TERT e do miR-124 consoante a gravidade das lesões.^{52,64}

Clarke *et al.* (2017) demonstraram que o grau de metilação dos genes SOX1, DCC e EPB41L3 se relaciona significativamente com a gravidade das lesões.⁶⁴ A deteção do grau de metilação destes genes apresenta boa sensibilidade e especificidade no rastreio do CCU.⁶⁴

8.4 MicroRNAs

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA, não codificantes, compostas por cerca de 18-25 nucleótidos.⁷⁸⁻⁸¹ A sua função é regular a expressão de genes através da ligação à região 3'UTR de mRNAs alvo, levando à sua destruição ou à inibição da tradução ^{78-80,82}. Geralmente têm vários mRNAs alvo e os mRNAs podem também ser regulados por vários microRNAs. ⁷⁹ Podem funcionar como oncogénicos, tendo geralmente um aumento da expressão e genes supressores tumorais como alvo, ou como supressores tumorais, em que se verifica o inverso.^{78, 81}

Tem sido demonstrada alteração da expressão de microRNAs em várias neoplasias malignas, sendo considerado que estes desempenham um papel importante nos diversos processos inerentes à carcinogénese. Recentemente, tem também sido reconhecido o seu papel na evolução do cancro do colo do útero, razão pela qual se começou a investigar a sua possível utilidade no rastreio. Recentemente

Vários estudos avaliaram a expressão diferencial de múltiplos microRNAs no CCU relativamente ao tecido cervical normal, mostrando diferenças significativas numa grande variedade de microRNAs.⁷⁸⁻⁸¹ Estes estudos têm, no entanto, algumas limitações, nomeadamente a existência de resultados significativamente diferentes ou até contraditórios quanto à desregulação da expressão de alguns microRNAs. Tal pode ocorrer devido à variedade de técnicas disponíveis para a sua quantificação, uso de diferentes métodos de análise estatística e heterogeneidade das amostras de participantes.⁸³

Pelo contrário, são poucos os estudos que avaliam a alteração da expressão de microRNAs específicos durante a progressão de tecido cervical normal, para lesão intraepitelial de baixo e alto grau e para carcinoma, e que mostram se este é ou não um método eficaz para utilizar no rastreio.⁷⁸

Num desses estudos, foi proposto o uso de um sistema de classificação baseado na quantificação de microRNAs em pares, para distinguir a gravidade das lesões. ⁸³ Assim, cada elemento do par funciona como "normalizador" do outro, ou seja, são evitados possíveis erros relacionados com a quantidade de material testado, heterogeneidade celular da amostra e erros relativos à técnica de quantificação. ⁸³ Concluíram que o melhor marcador molecular individual, entre os testados, é o miR-375, um conhecido supressor tumoral, tendo sido o menos dependente do par "normalizador". ⁸³ Outro estudo, realizado em mulheres HPV positivas, demonstrou que a expressão do miR-375, miR-424, miR-34a e miR-218 em células cervicais é significativamente inferior em lesões de alto grau relativamente a amostras normais e lesões de baixo grau. No entanto, apenas o miR-375 e o miR-424 obtiveram maior sensibilidade e VPN do que a citologia, sem diminuição da especificidade e VPP, sendo testes de rastreio mais eficazes. Foi ainda investigada a hipótese de utilizar

mais do que um microRNA simultaneamente, sendo que o conjunto miR-375/424/218 foi o teste com melhores resultados para a deteção de CIN2+ e o par miR-375/424 o teste com melhores resultados para a deteção de CIN3+.⁸⁴

Coimbra *et al.* (2016) avaliaram o miR-203 como marcador molecular, uma vez que este tem funções relacionadas com o controlo da proliferação e diferenciação celulares. Foi demonstrado que a sua expressão apresenta diferenças significativas entre LSIL, HSIL e carcinoma (diminuição da expressão de amostras normais para CIN1, elevação da expressão em CIN2 relativamente a CIN1 e posterior diminuição de CIN2 para CIN3 e de CIN3 para carcinoma).⁸⁵ Apesar destes resultados e de já ter sido implicado na carcinogénese cervical, diferentes estudos obtiveram resultados díspares quanto à sua expressão diferencial, pelo que será ainda necessário realizar estudos em amostras maiores de forma a validar a sua utilização como marcador.⁸⁵

Outro estudo propõe o miR-1246 para este efeito, também já previamente implicado na carcinogénese cervical, demonstrando que a sua expressão nos casos de carcinoma cervical é significativamente inferior relativamente às amostras normais. Neste caso, deparamo-nos novamente com resultados diferentes consoante o estudo, sendo necessária uma investigação mais aprofundada para garantir a sua utilidade.

Há ainda um estudo que mostra maior expressão do miR-25, miR-92a e miR-378 em lesões cervicais de elevado grau e em carcinoma. É sugerido o uso da razão entre a expressão de miR-25/92a e miR-22/29a para diagnosticar as lesões, uma vez que esta aumenta gradualmente consoante a sua gravidade.⁸⁷ Neste estudo, o miR-22 não sofreu alteração com o grau das lesões e a expressão do miR-29a diminuiu, mas, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.⁸⁷

8.5 BIRC5

A BIRC5 (ou *survivin*) é uma proteína inibidora da apoptose, que, no adulto, não é expressa em tecidos diferenciados. ⁸⁸⁻⁹⁰ A sua presença em células superficiais do colo do útero traduz uma alteração do ciclo celular. ⁸⁸⁻⁹⁰ Devido ao seu mecanismo de ação, essa alteração vai favorecer a progressão de neoplasias, pelo que tem sido demonstrado que a expressão da BIRC5 se encontra aumentada em cancros em humanos. ^{88,89,91} Pensa-se, também, que a oncoproteína E6 é responsável por um aumento da sua expressão no CCU, pelo que se começou a considerar a utilidade desta proteína como marcador molecular no rastreio. ⁸⁸ A expressão da proteína BIRC5 avalia-se através de imunocitoquímica ou imunohistoquímica, utilizando anticorpos anti-BIRC5, ou através da deteção do seu mRNA.

Estudos realizados através de imunocitoquímica e imunohistoquímica demonstraram que a expressão de BIRC5 está significativamente relacionada com a gravidade das lesões do colo do útero, sendo tanto maior quanto mais grave a lesão. Por esse motivo, poderá ser usada como marcador para a estratificação do risco de progressão das infeções por HPV. Um desses estudos concluiu que a BIRC5 é um marcador 100% específico de neoplasia intraepitelial do colo do útero, com VPP de 100%, uma vez que nunca ocorreu aumento da sua expressão em amostras normais. No entanto, conclui também que um resultado negativo com este teste não exclui a existência de lesão, uma vez que o VPN foi baixo. 89

Fan *et al.* (2018), através da deteção de mRNA da BIRC5, apesar de também terem concluído que o seu nível aumenta com a gravidade das lesões, referiram que a sua sensibilidade e especificidade como método de rastreio do CCU são relativamente baixas.⁹²

8.6 TOP2A e MCM2

Na oncogénese cervical, devido à ação da oncoproteína E7, há uma aceleração da entrada das células em fase S, levando a uma expressão prolongada de genes característicos desta fase, nomeadamente os genes TOP2A e MCM2. 93-96 A DNA topoisomerase tipo II é uma enzima nuclear que tem a capacidade de alterar a tipologia da molécula de DNA, sendo necessária para que ocorram alguns processos biológicos, como a replicação e a transcrição. 93,95,96 A MCM2 é também uma proteína nuclear, mas que regula o início da replicação nas sequências de "origem da replicação" do DNA e funciona como marcador de proliferação celular, sendo que, no epitélio cervical normal, apenas está presente na camada basal proliferativa. 93-96 Estas duas moléculas têm a sua expressão aumentada em vários carcinomas em humanos, nomeadamente no carcinoma cervical, tendo sido propostas como marcadores moleculares no CCU, trazendo potenciais vantagens ao rastreio. 93-95 Consoante os estudos, foram testadas separadamente ou em conjunto, sendo que a TOP2A também mostra vantagens quando testada juntamente com a proteína ki-67.

A avaliação isolada da expressão da MCM2 mostrou que esta se correlaciona com a gravidade das lesões e que o seu uso concomitante ao HPV poderá levar a uma melhoria da sensibilidade e especificidade do rastreio.⁹⁴

Outros estudos relativos a estas proteínas, que avaliaram a eficácia de um teste composto por anticorpos anti-MCM2 e anti-TOP2A, concluíram também que a sua expressão se correlaciona significativamente com a gravidade das lesões, considerando que este teste tem elevada sensibilidade e especificidade. Foi também referido que poderá ter um papel no aumento da sensibilidade e especificidade relativamente ao uso isolado da citologia e, simultaneamente, terá também maior especificidade que a deteção de HPV, podendo efetivamente representar um bom teste para definir a necessidade de uma estratégia agressiva ou, pelo contrário, conservadora.

Peres *et al.* (2016) avaliaram o uso concomitante de anticorpos anti-TOP2A e anti-ki-67 e obtiveram resultados promissores (ainda que preliminares), sugerindo o seu uso em casos HPV positivos para definir quais as infeções com maior ou menor risco de progressão.⁹⁷

9 Discussão e conclusão

Uma vez que o cancro do colo do útero é uma das doenças oncológicas mais comuns em mulheres, é necessária a existência de um programa de rastreio bem estabelecido que reduza a morbilidade e mortalidade associadas a este cancro. Sabemos também que a infeção por HPV está correlacionada com o cancro do colo do útero, mas que, na maior parte dos casos, as infeções regridem, sendo que apenas algumas progridem para cancro. Assim, são necessários novos marcadores moleculares capazes de diferenciar as infeções por HPV clinicamente relevantes das transitórias, evitando referenciações para colposcopia desnecessárias. Alguns dos novos marcadores são a dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67, a deteção de mRNA das oncoproteínas E6/E7 dos HPV de alto risco, a deteção do grau de metilação do genoma viral e do genoma do hospedeiro, a deteção de microRNAs e a expressão das proteínas BIRC5, TOP2A e MCM2.

Uma grande vantagem que estes marcadores apresentam, relativamente, por exemplo, à citologia, é o facto de serem objetivos e, consequentemente, o seu uso ser menos dependente do observador, deixando menor margem para dúvidas e permitindo a obtenção de resultados reprodutíveis. Tal é particularmente relevante em locais com falta de técnicos treinados e experientes que avaliem as citologias.

A dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67 é o marcador mais investigado entre os descritos. Em praticamente todos os estudos realizados, apresenta vantagens quando utilizada no rastreio de cancro do colo do útero, devido à sinalização de infeções com maior probabilidade de progressão. Demonstra ser particularmente útil na estratificação do risco de mulheres HPV positivas ou após resultados citológicos de LSIL, ASC-US e ASC-H. Antes de ser considerada como teste primário de rastreio, é referida a necessidade de estudos que permitam definir qual o intervalo de tempo em que um teste negativo traduz uma baixa probabilidade de ocorrência de lesões de alto grau, ou seja, quando deveriam estas mulheres ser novamente testadas. Está ainda por apurar qual a melhor estratégia de rastreio utilizando a dupla marcação imunocitoquímica, sendo necessário avaliar a relação custo/beneficio deste teste antes de ser implementado nas estratégias de rastreio organizado. O seu uso em casos particulares, para estratificação do risco, será, no entanto, benefico.

A deteção do mRNA das oncoproteínas E6/E7 dos HPV de alto risco traduz uma infeção com provável progressão maligna, ao contrário do que acontece com a deteção de HPV, que não distingue infeções transitórias de infeções persistentes. Assim, este teste traz vantagens ao rastreio do cancro do colo do útero, nomeadamente através do aumento da especificidade, em qualquer das três dimensões em que é estudado. Será apenas

necessária a confirmação, através de novos estudos, de que a utilização de testes com maior abrangência em termos de HPV de alto risco permitirá uma elevada sensibilidade.

A deteção da metilação de genes de HPV de alto risco parece ser uma técnica promissora para o rastreio do CCU, sendo os genes aparentemente mais vantajosos o L1 e o L2. No entanto, os estudos nesta área apresentam ainda algumas limitações, nomeadamente o facto de grande parte terem sido realizados em infeções apenas pelo HPV16, o facto de não estar ainda definido se será mais eficaz a utilização de um *cutoff* de percentagem de metilação (e qual esse *cutoff*) ou a investigação do estado de metilação de dinucleótidos CpG específicos, e ainda qual o método de quantificação da metilação que deverá ser utilizado (uma vez que há uma grande heterogeneidade de métodos disponíveis).

A deteção da metilação de genes do hospedeiro apresenta também resultados positivos, uma vez que há uma elevada metilação de vários genes em amostras com lesões mais graves e uma metilação muito baixa em amostras normais ou com lesões de baixo grau. Por outro lado, os estudos atualmente disponíveis apresentam uma elevada variedade quanto aos genes estudados, sendo que falta ainda definir quais os genes que serão mais eficazes no rastreio do cancro do colo do útero. Tal como referido anteriormente, há também uma grande heterogeneidade relativamente aos métodos de quantificação da metilação utilizados nos diferentes estudos.

Quanto à expressão diferencial de microRNAs, esta parece também apresentar vantagens no rastreio do cancro do colo do útero, sendo ainda necessário definir quais os microRNAs mais eficazes para o efeito, tendo em conta que há resultados muito díspares nesta área e que são poucos os estudos que efetivamente avaliam a utilidade de microRNAs específicos no rastreio.

A proteína BIRC5, devido à sua função, é também um marcador promissor para a estratificação do risco no rastreio do cancro do colo do útero, uma vez que favorece a progressão de neoplasias. Há, no entanto, poucos estudos que avaliem a sua eficácia, sendo ainda necessário averiguar qual a melhor forma de testar a sua expressão e realizar estudos em amostras mais significativas.

As proteínas TOP2A e MCM2 devem também ser referidas como potenciais marcadores para serem investigados em futuros estudos, uma vez que os estudos nesta área são ainda pouco claros.

Em resumo, os novos marcadores moleculares previamente referidos poderão trazer vantagens ao rastreio do cancro do colo do útero, sendo que os testes que apresentam maior evidência desse benefício são a dupla marcação imunocitoquímica p16/ki-67 e a deteção de mRNA das oncoproteínas E6/E7 de HPV de alto risco. Estes testes sinalizam

lesões mais graves e com maior probabilidade de progressão e podem reduzir o número de referenciações para colposcopia desnecessárias. A deteção do grau de metilação e a deteção de microRNAs são novos testes bastante promissores, sendo necessária a realização de estudos com amostras mais significativas, de forma a definir quais serão os melhores genes e microRNAs na estratificação do risco de cancro do colo do útero. As proteínas BIRC5, TOP2A e MCM2 demonstram capacidade de diferenciar as lesões quanto à sua gravidade, no entanto, os estudos realizados são ainda pouco consensuais, sendo necessária a realização de novos estudos, com amostras mais significativas.

A infeção por HPV é condição necessária ao desenvolvimento de CCU, mas outros fatores intervêm no processo de carcinogénese, nomeadamente o microbioma e as respostas inflamatória e imunitária locais, sendo estes tópicos também interessantes no futuro desta área, para além dos já descritos.

10 Agradecimentos

Desejo expressar o meu agradecimento à Doutora Teresa Rebelo, pela orientação, disponibilidade e apoio prestados ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço também à Professora Doutora Margarida Figueiredo Dias, por estar sempre disponível ao longo deste processo e pela sua ajuda perante qualquer imprevisto ocorrido.

11 Referências bibliográficas

- 1. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN Cancer Today. 2018. [Available from: http://gco.iarc.fr/today/home] Accessed 2018.
- 2. Programa nacional para as doenças oncológicas. Programa nacional para as doenças oncológicas 2017. 2017:1-24.
- 3. World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. 2018. [Available from: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer] [Accessed 2018].
- 4. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. Seminars in cancer biology. 2014;26:13-21.
- 5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. The Journal of pathology. 1999;189(1):12-9.
- 6. International Agency for Research on Cancer. Biological agents Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.2012. p. 255-313.
- 7. National Cancer Institute. HPV and cancer. 2015. [Available from: https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet] [Accessed 2018].
- 8. International Agency for Research on Cancer. Agents classified by the IARC monographs 2018 [Available from: https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/] [Accessed 2018].
- 9. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Consenso nacional sobre vacinas contra o HPV. 2017:1-47.
- 10. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2005;32 Suppl 1:S7-15.
- 11. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. Front Microbiol. 2012;3:152.
- 12. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. Future virology. 2011;6(1):45-57.
 - 13. Direção Geral de Saúde. Programa nacional de Vacinação. 2017:1-96.

- 14. Luxembourg A, Moeller E. 9-Valent human papillomavirus vaccine: a review of the clinical development program. Expert review of vaccines. 2017;16(11):1119-39.
 - 15. Direção Geral de Saúde. Boletim programa nacional de vacinação nº1. 2018:1-8.
- 16. Sociedade portuguesa de ginecologia. Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina. 2014:1-21.
- 17. Mahmud SM, Sangwa-Lugoma G, Nasr SH, Kayembe PK, Tozin RR, Drouin P, et al. Comparison of human papillomavirus testing and cytology for cervical cancer screening in a primary health care setting in the Democratic Republic of the Congo. Gynecologic oncology. 2012;124(2):286-91.
- 18. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. Jama. 2002;287(16):2114-9.
- 19. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated." (after a quotation from Mark Twain). Acta cytologica. 2015;59(2):121-32.
- 20. Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Moschaki V, Panteleris N, Agorastos T. Comparison of cytology, HPV DNA testing and HPV 16/18 genotyping alone or combined targeting to the more balanced methodology for cervical cancer screening. Gynecologic oncology. 2016;142(1):120-7.
- 21. Yu LL, Guo HQ, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Kang LN, et al. p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: a 3-year cohort study in China. Oncotarget. 2016;7(40):64810-9.
- 22. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. Cancer cytopathology. 2014;122(12):914-20.
- 23. Celewicz A, Celewicz M, Wezowska M, Chudecka-Glaz A, Menkiszak J, Urasinska E. Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer. Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists. 2018;69(1):42-7.
- 24. Zappacosta R, Colasante A, Viola P, D'Antuono T, Lattanzio G, Capanna S, et al. Chromogenic in situ hybridization and p16/Ki67 dual staining on formalin-fixed paraffinembedded cervical specimens: correlation with HPV-DNA test, E6/E7 mRNA test, and potential clinical applications. BioMed research international. 2013;2013:453606.

- 25. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. Journal of the National Cancer Institute. 2013;105(20):1550-7.
- 26. Yu LL, Chen W, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Pan QJ, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. Oncotarget. 2016;7(16):21181-9.
- 27. Prigenzi KCK, Heinke T, Salim RC, Focchi GRA. Dual p16 and Ki-67 Expression in Liquid-Based Cervical Cytological Samples Compared to Pap Cytology Findings, Biopsies, and HPV Testing in Cervical Cancer Screening: A Diagnostic Accuracy Study. Acta cytologica. 2018;62(2):104-14.
- 28. Ovestad IT, Dalen I, Hansen E, Loge JL, Dybdahl BM, Dirdal MB, et al. Clinical value of fully automated p16/Ki-67 dual staining in the triage of HPV-positive women in the Norwegian Cervical Cancer Screening Program. Cancer cytopathology. 2017;125(4):283-91.
- 29. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. Journal of the National Cancer Institute. 2015;107(12):djv257.
- 30. Ebisch RM, van der Horst J, Hermsen M, Rijstenberg LL, Vedder JE, Bulten J, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2017;30(7):1021-31.
- 31. Wright TC, Jr., Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. Gynecologic oncology. 2017;144(1):51-6.
- 32. Gustinucci D, Giorgi Rossi P, Cesarini E, Broccolini M, Bulletti S, Carlani A, et al. Use of Cytology, E6/E7 mRNA, and p16INK4a-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening. American journal of clinical pathology. 2016;145(1):35-45.
- 33. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. International journal of cancer. 2015;136(10):2361-8.
- 34. Uijterwaal MH, Witte BI, Van Kemenade FJ, Rijkaart D, Ridder R, Berkhof J, et al. Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. British journal of cancer. 2014;110(6):1579-86.

- 35. Tay TKY, Lim KL, Hilmy MH, Thike AA, Goh ST, Song LH, et al. Comparison of the sensitivity and specificity of p16/Ki-67 dual staining and HPV DNA testing of abnormal cervical cytology in the detection of histology proven cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and above (CIN 2+). The Malaysian journal of pathology. 2017;39(3):257-65.
- 36. Ziemke P, Marquardt K, Griesser H. Predictive value of the combined p16 and Ki-67 immunocytochemistry in low-grade squamous intraepithelial lesions. Acta cytologica. 2014;58(5):489-94.
- 37. Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K, et al. Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. International journal of clinical oncology. 2015;20(1):134-42.
- 38. Liu S, Minaguchi T, Lachkar B, Zhang S, Xu C, Tenjimbayashi Y, et al. Separate analysis of human papillomavirus E6 and E7 messenger RNAs to predict cervical neoplasia progression. PloS one. 2018;13(2):e0193061.
- 39. Liu TY, Xie R, Luo L, Reilly KH, He C, Lin YZ, et al. Diagnostic validity of human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples. Journal of virological methods. 2014;196:120-5.
- 40. Basu P, Banerjee D, Mittal S, Dutta S, Ghosh I, Chowdhury N, et al. Sensitivity of APTIMA HPV E6/E7 mRNA test in comparison with hybrid capture 2 HPV DNA test for detection of high risk oncogenic human papillomavirus in 396 biopsy confirmed cervical cancers. Journal of medical virology. 2016;88(7):1271-8.
- 41. Duvlis S, Popovska-Jankovic K, Arsova ZS, Memeti S, Popeska Z, Plaseska-Karanfilska D. HPV E6/E7 mRNA versus HPV DNA biomarker in cervical cancer screening of a group of Macedonian women. Journal of medical virology. 2015;87(9):1578-86.
- 42. Wang HY, Lee D, Park S, Kim G, Kim S, Han L, et al. Diagnostic Performance of HPV E6/E7 mRNA and HPV DNA Assays for the Detection and Screening of Oncogenic Human Papillomavirus Infection among Woman with Cervical Lesions in China. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2015;16(17):7633-40.
- 43. Valenca JE, Goncalves AK, Guerreiro da Silva ID, Eleuterio Junior J, Tenorio da Silva T, Bruneska D, et al. High Risk HPV E6/E7 Oncoprotein Expression in Women with High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia. 2016;38(3):154-9.

- 44. Reid JL, Wright TC, Jr., Stoler MH, Cuzick J, Castle PE, Dockter J, et al. Human papillomavirus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening: baseline and longitudinal results from the CLEAR study. American journal of clinical pathology. 2015;144(3):473-83.
- 45. Wang HY, Park S, Lee D, Kim S, Kim G, Park KH, et al. Prevalence of type-specific oncogenic human papillomavirus infection assessed by HPV E6/E7 mRNA among women with high-grade cervical lesions. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2015;37:135-42.
- 46. Fontecha N, Basaras M, Hernaez S, Andia D, Cisterna R. Assessment of human papillomavirus E6/E7 oncogene expression as cervical disease biomarker. BMC cancer. 2016;16(1):852.
- 47. Yao YL, Tian QF, Cheng B, Cheng YF, Ye J, Lu WG. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA detection in cervical exfoliated cells: a potential triage for HPV-positive women. Journal of Zhejiang University Science B. 2017;18(3):256-62.
- 48. Zappacosta R, Gatta DM, Marinucci P, Capanna S, Lattanzio G, Caraceni D, et al. Role of E6/E7 mRNA test in the diagnostic algorithm of HPV-positive patients showing ASCUS and LSIL: clinical and economic implications in a publicly financed healthcare system. Expert review of molecular diagnostics. 2015;15(1):137-50.
- 49. Stoler MH, Wright TC, Jr., Cuzick J, Dockter J, Reid JL, Getman D, et al. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. American journal of obstetrics and gynecology. 2013;208(2):144.e1-8.
- 50. Lorincz AT. Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. Acta cytologica. 2016;60(6):501-12.
- 51. Bhat S, Kabekkodu SP, Noronha A, Satyamoorthy K. Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer. Biochimie. 2016;121:298-311.
- 52. Milutin Gasperov N, Sabol I, Planinic P, Grubisic G, Fistonic I, Corusic A, et al. Methylated Host Cell Gene Promoters and Human Papillomavirus Type 16 and 18 Predicting Cervical Lesions and Cancer. PloS one. 2015;10(6):e0129452.
- 53. Niyazi M, Sui S, Zhu K, Wang L, Jiao Z, Lu P. Correlation between Methylation of Human Papillomavirus-16 L1 Gene and Cervical Carcinoma in Uyghur Women. Gynecologic and obstetric investigation. 2017;82(1):22-9.
- 54. Chaiwongkot A, Niruthisard S, Kitkumthorn N, Bhattarakosol P. Quantitative methylation analysis of human papillomavirus 16L1 gene reveals potential biomarker for

cervical cancer progression. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2017;89(4):265-70.

- 55. Qiu C, Zhi Y, Shen Y, Gong J, Li Y, Rong S, et al. Performance of the HPV-16 L1 methylation assay and HPV E6/E7 mRNA test for the detection of squamous intraepithelial lesions in cervical cytological samples. Journal of virological methods. 2015;224:35-41.
- 56. Kalantari M, Osann K, Calleja-Macias IE, Kim S, Yan B, Jordan S, et al. Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: Considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia. Virology. 2014;448:314-21.
- 57. Frimer M, Sun C, McAndrew T, Smith B, Harari A, Chen Z, et al. HPV16 CpG methyl-haplotypes are associated with cervix precancer and cancer in the Guanacaste natural history study. Gynecologic oncology. 2015;138(1):94-100.
- 58. Mirabello L, Frimer M, Harari A, McAndrew T, Smith B, Chen Z, et al. HPV16 methyl-haplotypes determined by a novel next-generation sequencing method are associated with cervical precancer. International journal of cancer. 2015;136(4):E146-53.
- 59. Simanaviciene V, Popendikyte V, Gudleviciene Z, Zvirbliene A. Different DNA methylation pattern of HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection as compared to cervical neoplasia. Virology. 2015;484:227-33.
- 60. Brandsma JL, Harigopal M, Kiviat NB, Sun Y, Deng Y, Zelterman D, et al. Methylation of twelve CpGs in human papillomavirus type 16 (HPV16) as an informative biomarker for the triage of women positive for HPV16 infection. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa). 2014;7(5):526-33.
- 61. Bryant D, Hibbitts S, Almonte M, Tristram A, Fiander A, Powell N. Human papillomavirus type 16 L1/L2 DNA methylation shows weak association with cervical disease grade in young women. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2015;66:66-71.
- 62. Liu P, Iden M, Fye S, Huang YW, Hopp E, Chu C, et al. Targeted, Deep Sequencing Reveals Full Methylation Profiles of Multiple HPV Types and Potential Biomarkers for Cervical Cancer Progression. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2017;26(4):642-50.
- 63. Vasiljevic N, Scibior-Bentkowska D, Brentnall A, Cuzick J, Lorincz A. A comparison of methylation levels in HPV18, HPV31 and HPV33 genomes reveals similar associations with cervical precancers. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2014;59(3):161-6.

- 64. Clarke MA, Luhn P, Gage JC, Bodelon C, Dunn ST, Walker J, et al. Discovery and validation of candidate host DNA methylation markers for detection of cervical precancer and cancer. International journal of cancer. 2017;141(4):701-10.
- 65. De Strooper LM, Meijer CJ, Berkhof J, Hesselink AT, Snijders PJ, Steenbergen RD, et al. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa). 2014;7(12):1251-7.
- 66. Luttmer R, De Strooper LM, Berkhof J, Snijders PJ, Dijkstra MG, Uijterwaal MH, et al. Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). International journal of cancer. 2016;138(4):992-1002.
- 67. Kim MK, Lee IH, Lee KH, Lee YK, So KA, Hong SR, et al. DNA methylation in human papillomavirus-infected cervical cells is elevated in high-grade squamous intraepithelial lesions and cancer. Journal of gynecologic oncology. 2016;27(2):e14.
- 68. De Strooper LM, Hesselink AT, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD, et al. Combined CADM1/MAL methylation and cytology testing for colposcopy triage of highrisk HPV-positive women. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2014;23(9):1933-7.
- 69. Verhoef VM, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Heideman DA, Bosgraaf RP, Hesselink AT, et al. Follow-up of high-risk HPV positive women by combined cytology and bimarker CADM1/MAL methylation analysis on cervical scrapes. Gynecologic oncology. 2015;137(1):55-9.
- 70. Wang ZM. PAX1 methylation analysis by MS-HRM is useful in triage of high-grade squamous intraepithelial lesions. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2014;15(2):891-4.
- 71. Li SR, Wang ZM, Wang YH, Wang XB, Zhao JQ, Xue HB, et al. Value of PAX1 Methylation Analysis by MS-HRM in the Triage of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2015;16(14):5843-6.
- 72. Chujan S, Kitkumthorn N, Siriangkul S, Mutirangura A. CCNA1 promoter methylation: a potential marker for grading Papanicolaou smear cervical squamous intraepithelial lesions. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2014;15(18):7971-5.

- 73. Zuo Q, Zheng W, Zhang J, Pan Z, Liu Y, Long H, et al. Methylation in the promoters of HS3ST2 and CCNA1 genes is associated with cervical cancer in Uygur women in Xinjiang. The International journal of biological markers. 2014;29(4):e354-62.
- 74. Yin A, Zhang Q, Kong X, Jia L, Yang Z, Meng L, et al. JAM3 methylation status as a biomarker for diagnosis of preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. Oncotarget. 2015;6(42):44373-87.
- 75. Hansel A, Steinbach D, Greinke C, Schmitz M, Eiselt J, Scheungraber C, et al. A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. PloS one. 2014;9(3):e91905.
- 76. Schmitz M, Wunsch K, Hoyer H, Scheungraber C, Runnebaum IB, Hansel A, et al. Performance of a methylation specific real-time PCR assay as a triage test for HPV-positive women. Clinical epigenetics. 2017;9:118.
- 77. Rogeri CD, Silveira HCS, Causin RL, Villa LL, Stein MD, de Carvalho AC, et al. Methylation of the hsa-miR-124, SOX1, TERT, and LMX1A genes as biomarkers for precursor lesions in cervical cancer. Gynecologic oncology. 2018;150(3):545-51.
- 78. Diaz-Gonzalez Sdel M, Deas J, Benitez-Boijseauneau O, Gomez-Ceron C, Bermudez-Morales VH, Rodriguez-Dorantes M, et al. Utility of microRNAs and siRNAs in cervical carcinogenesis. BioMed research international. 2015;2015:374924.
- 79. Mo W, Tong C, Zhang Y, Lu H. microRNAs' differential regulations mediate the progress of Human Papillomavirus (HPV)-induced Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). BMC systems biology. 2015;9:4.
- 80. Gao D, Zhang Y, Zhu M, Liu S, Wang X. miRNA Expression Profiles of HPV-Infected Patients with Cervical Cancer in the Uyghur Population in China. PloS one. 2016;11(10):e0164701.
- 81. Jimenez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Fernandez-Tilapa G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). Oncology reports. 2014;31(6):2467-76.
- 82. Jimenez-Wences H, Martinez-Carrillo DN, Peralta-Zaragoza O, Campos-Viguri GE, Hernandez-Sotelo D, Jimenez-Lopez MA, et al. Methylation and expression of miRNAs in precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection. Oncology reports. 2016;35(4):2297-305.
- 83. Ivanov MK, Titov SE, Glushkov SA, Dzyubenko VV, Malek AV, Arkhangelskaya PA, et al. Detection of high-grade neoplasia in air-dried cervical PAP smears by a microRNA-based classifier. Oncology reports. 2018;39(3):1099-111.

- 84. Tian Q, Li Y, Wang F, Xu J, Shen Y, Ye F, et al. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. Journal of the National Cancer Institute. 2014;106(9).
- 85. Coimbra EC, M DACGL, Junior MR, TH DEO, J DACSN, AC DEF. Expression Profile of MicroRNA-203 and its DeltaNp63 Target in Cervical Carcinogenesis: Prospects for Cervical Cancer Screening. Anticancer research. 2016;36(8):3939-46.
- 86. Yang Y, Xie YJ, Xu Q, Chen JX, Shan NC, Zhang Y. Down-regulation of miR-1246 in cervical cancer tissues and its clinical significance. Gynecologic oncology. 2015;138(3):683-8.
- 87. Wang X, Wang HK, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, et al. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(11):4262-7.
- 88. Borbely AA, Murvai M, Konya J, Beck Z, Gergely L, Li F, et al. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. The Journal of general virology. 2006;87(Pt 2):287-94.
- 89. Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Costa S, et al. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. American journal of clinical pathology. 2005;124(1):113-21.
- 90. Indarti J, Aziz MF, Suryawati B, Fernando D. Scoring system and management algorithm assessing the role of survivin expression in predicting progressivity of HPV infections in precancerous cervical lesions. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2013;14(3):1643-7.
- 91. Barbosa LC, da Silva ID, Correa JC, Ribalta JC. Survivin and telomerase expression in the uterine cervix of women with human papillomavirus-induced lesions. International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society. 2011;21(1):15-21.
- 92. Fan Y, Shen Z. The clinical value of HPV E6/E7 and STAT3 mRNA detection in cervical cancer screening. Pathology, research and practice. 2018;214(5):767-75.
- 93. Dixon EP, King LM, Nelson R, Simkins SG, Knapp SL, Brough GH, et al. Characterization and clinical validation of MCM2 and TOP2A monoclonal antibodies in the BD ProEx C assay: An immunoassay which detects aberrant S-phase induction in cervical tissue. Journal of immunological methods. 2017;442:35-41.

- 94. Zheng J. Diagnostic value of MCM2 immunocytochemical staining in cervical lesions and its relationship with HPV infection. International journal of clinical and experimental pathology. 2015;8(1):875-80.
- 95. Sanati S, Huettner P, Ylagan LR. Role of ProExC: a novel immunoperoxidase marker in the evaluation of dysplastic squamous and glandular lesions in cervical specimens. International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists. 2010;29(1):79-87.
- 96. Tambouret RH, Misdraji J, Wilbur DC. Longitudinal clinical evaluation of a novel antibody cocktail for detection of high-grade squamous intraepithelial lesions on cervical cytology specimens. Archives of pathology & laboratory medicine. 2008;132(6):918-25.
- 97. Peres AL, Paz ESKM, de Araujo RF, de Lima Filho JL, de Melo Junior MR, Martins DB, et al. Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care. Journal of biomedical science. 2016;23(1):42.