

Artículos Originales

(<http://www.siicsalud.com/main/expinv.htm>)

Las normas de divulgación biomédica acotan las posibilidades de comunicación de los investigadores o los someten a rígidos esquemas editoriales que, en oportunidades, limitan la redacción y, en consecuencia, la posterior comprensión de los lectores. SIIC propone escribir sin ataduras a renombrados médicos del mundo.

Las estrictas supervisiones científicas y literarias a que son sometidos los Artículos Originales aseguran documentación de calidad, en temas de importancia estratégica.

A - Detección Selectiva de la Infección por HIV Durante el Embarazo



Dr. Richard M. Grimes

Columnista experto

Sociedad Iberoamericana de Información Científica

Función que desempeña: Associate Professor of Management and Policy Sciences, School of Public Health at the University of Texas Houston Health Science Center, Houston, Texas, EE.UU.

Otro trabajo de su autoría: Grimes RM, Lal L, Lewis ST: Frequency of medical history items, drug interactions and

lifestyle characteristics that may interfere with antiretroviral medications, HIV Clinical Trials 3:161-167, 2002.

Participaron en la investigación: Nancy L. Eriksen MD and Andrew W. Helfgott.

Introducción

Se acepta que el estudio serológico para la detección de infección por HIV durante el embarazo puede asociarse con beneficios potenciales, tanto para la madre como para el feto. Entre las ventajas hay que mencionar la posibilidad de iniciar el tratamiento en forma precoz, lo cual es de gran beneficio. De hecho, existe evidencia sustancial de que el tratamiento apropiado precoz de la infección por HIV mejora la evolución de los pacientes con terapia antirretroviral.

Por lo tanto, la detección de la infección por HIV en la gestación permite que la madre pueda ser tratada más tempranamente y que reciba el tratamiento antiHIV que reduce la morbilidad y aumenta la sobrevida.¹ Además, la identificación prematura de la infección también permite que la mujer reciba la terapia profiláctica para infecciones oportunistas asociadas con la infección por HIV. Está establecido que la medida prolonga y mejora la calidad de vida.²

Conocer el estado de infección por HIV de una mujer embarazada también tiene un beneficio para el niño. La transmisión del HIV de madre a hijo es aproximadamente del 40% en las mujeres que amamantan. Se considera que no utilizar esta forma de alimentación reduce el índice en alrededor de un 14%.³ También es sabido que es mucho menos probable que las mujeres tratadas con antirretrovirales durante la gestación transmitan el virus a la descendencia. El estudio clásico (llamado protocolo 076) mostró que las madres e hijos que reciben monoterapia con zidovudina (AZT) tienen reducción del riesgo de transmisión del orden del 25.6% al 8.3%. Las mujeres del estudio recibieron AZT oral antes de la semana 34 de gestación y en forma intravenosa durante el trabajo del parto. Asimismo, los hijos recibieron AZT en jarabe desde inmediatamente después del nacimiento y durante las seis semanas posteriores.⁴ También hay evidencia de que la práctica obstétrica puede reducir el riesgo de transmisión materno-fetal del HIV. Landesman y colaboradores mostraron que la ruptura prematura de membranas se asocia con mayor probabilidad de transmisión del HIV.⁵

Además, un metaanálisis del riesgo de transmisión mostró que el

uso de AZT junto con la cesárea programada y la no alimentación a pecho pueden reducir el riesgo de transmisión a un escaso 2%.⁶

Debido a que el conocimiento del estado de infección por HIV en mujeres gestantes tiene enormes consecuencias para la madre y para el niño, muchos programas gubernamentales recomiendan el estudio serológico como parte de la atención prenatal. El estado de Texas, en los Estados Unidos, promulgó una ley para que el profesional ofrezca a la mujer la posibilidad de estudio serológico en la primera visita y en el momento del parto. La conducta se asocia con el beneficio de poder comenzar con la terapia antirretroviral antes del nacimiento, de evitar la ruptura prematura de membranas y de planificar la cesárea, con la finalidad de reducir el riesgo de transmisión materno-fetal. Asimismo, brinda la posibilidad de comenzar el tratamiento antiviral en la madre lo antes posible y permite al profesional aconsejar sobre las formas más seguras de alimentación del recién nacido. El requisito de repetir el estudio serológico en el momento del parto asume la posibilidad de que un determinado número de mujeres seroconvierte durante la gestación. Nuevamente, la información en ese momento es útil para desalentar la lactancia materna.

Primera pesquisa de infección materna

Sin embargo, el índice de seroconversión durante el embarazo no era conocido. Por ende, los autores realizaron un estudio en 97 mujeres que tuvieron serología positiva en el momento del parto, durante 1996 y 1997, en dos hospitales académicos del *University of Texas Houston Health Science Center*. Se revisaron las historias clínicas de las mujeres para saber si habían tenido un resultado positivo en la etapa de atención prenatal, con lo cual podrían determinar la seroconversión durante la gestación. No encontraron resultados compatibles con seroconversión durante el embarazo; 30 de las 97 mujeres sabían que estaban infectadas antes de la concepción por lo que el primer estudio y la repetición en el momento del parto no proporcionaron información útil. La ausencia de seroconversión sugirió, además, que la reevaluación posterior sería de poco valor.

No obstante, 21 de las 67 mujeres que desconocían su estado de infección antes del embarazo no recibieron atención prenatal (n = 11) o recibieron el primer control después de la semana 34 de gestación (n = 10). Esta edad gestacional es importante porque el protocolo 076 acerca del uso de AZT en embarazo fue realizado en pacientes que recibieron el antiviral antes de la semana 34 de gestación. Por lo tanto, para ese entonces se consideraba crucial la valoración antes de esa fecha de gestación. Sobre esa base, en 10 de las 67 (15%) mujeres con diagnóstico reciente, la detección de la infección se realizó demasiado tarde como para recibir el beneficio máximo de la terapia antirretroviral. Sin embargo, el diagnóstico en ese momento aun permitió evitar el riesgo relacionado con la ruptura prematura de membranas y con la lactancia y programar la cesárea. En un 16% adicional (n = 11) de la cohorte, el diagnóstico de infección por HIV se efectuó demasiado tarde como para que las medidas terapéuticas redujeran el riesgo de infección fetal a partir del tratamiento antiviral, la ruptura prematura de membranas y la cesárea electiva. Sin embargo, todavía hubo tiempo de evitar la lactancia.



Información adicional en www.siicsalud.com: dirección de correspondencia, bibliografía completa, abstract, full text, aprobación y patrocinio.

Así, la detección del estado de infección por HIV al inicio del cuidado prenatal y nuevamente en el momento del parto tiene algún beneficio en relación con la reducción potencial de transmisión perinatal del HIV. El estudio reveló la importancia de efectuar el estudio serológico en el momento del parto en mujeres que no habían recibido cuidados prenatales.

Además, quedó demostrada la importancia de aconsejar y educar a las mujeres que tienen riesgo de infección por HIV a que soliciten atención prenatal en forma precoz. Los esfuerzos deberían formar parte de todo programa integral destinado a reducir la transmisión del HIV de madre a hijo durante el periodo perinatal.⁷

Estudios de seguimiento

Desde la terminación del estudio en 1997, varias investigaciones demostraron el valor de conocer el estado de infección por HIV en la madre, aun en forma tardía durante la gestación.

Un trabajo realizado en Tailandia reveló que el índice de transmisión viral de la madre al feto era del 8.3% cuando la madre HIV positiva iniciaba el tratamiento con AZT en la semana 35 de la gestación y cuando los hijos recibían la droga durante tres días después del nacimiento.⁸

Los hallazgos se confirmaron en un estudio que comparó mujeres que iniciaron el tratamiento antiviral entre las semanas 36 a 38 de la gestación y aquellas que recibieron placebo.

El índice de transmisión en este último grupo fue del 27.5% versus un 18% en el grupo activo.⁹ Un trabajo similar, de Uganda, mostró que la administración de nevirapina o de AZT a la madre, durante el trabajo de parto, y a sus hijos después del nacimiento, podía reducir el índice de transmisión del HIV a un 8.2% (en el grupo tratado con nevirapina) y a un 10.4% en el grupo que recibió AZT. En el primer grupo (nevirapina), las madres recibieron una única dosis oral al inicio del trabajo de parto y los hijos recibieron una única dosis dentro de los tres primeros días de vida. Las madres tratadas con AZT recibieron una combinación oral e intravenosa del medicamento y los infantes fueron tratados con dos dosis diarias durante 7 días después del nacimiento.¹⁰ Wade y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo acerca del efecto de la administración de AZT a la madre en el momento del parto, y al niño después del nacimiento, sobre la transmisión de la infección. Encontraron que el protocolo 076 completo no era necesario para lograr una reducción sustancial del índice de transmisión de madre a hijo. Cuando las mujeres recibieron el protocolo 076 completo, el índice de contagio fue del 6.3%.

Sin embargo, si la madre sólo recibía AZT durante el parto, el índice de transmisión era del 10%. En caso de que el niño comenzara a recibir AZT dentro de las 48 horas posteriores al nacimiento, el índice de infección era del 9.3% mientras que se elevaba a un 18.4% cuando el tratamiento se iniciaba al tercer día del parto o en forma más tardía. En ausencia de profilaxis con AZT, el índice de transmisión fue del 26.6%.¹¹

Todos los trabajos mostraron la importancia de descubrir la infección en la madre durante el embarazo avanzado. Además, revelaron la importancia de reconsiderar el valor de determinar la seroconversión durante la gestación. Los profesionales del Centro Inmunológico de Mujeres (NLE), en uno de los dos hospitales del estudio original, continuaron controlando la población de mujeres embarazadas asistidas en la clínica con el objetivo de detectar seroconversión antes del estudio prenatal y en el momento del parto. Durante enero de 1997 y febrero de 2002, 180 mujeres de las cuales pudieron revisarse las historias clínicas fueron positivas en el momento del parto. Entre ellas, tres que habían sido seronegativas en el primer control prenatal fueron positivas en esa instancia. El seguimiento confirmó el beneficio de repetir la serología, que no se había constatado en el estudio original. La posibilidad de seroconversión durante el periodo de atención prenatal quedó confirmada.

Recomendaciones para la obtención de máximos beneficios

El rastreo de infección por HIV en el momento del parto duplica los costos de la determinación perinatal. Durante el parto, la

determinación representa un gasto de apenas 16 dólares, incluidos los honorarios del técnico.¹² Debido a que en otros países el costo del parto es aun menor, también es posible que el gasto total sea incluso más bajo.

Si bien no es un gasto trivial, el segundo estudio serológico parece asociarse con un beneficio real para un número pequeño de mujeres y sus hijos. El rastreo en el momento del nacimiento parece de valor particular para niños de madres que no reciben o que reciben escasa atención prenatal. Además, el estudio de seguimiento sugiere que puede existir cierto beneficio del rastreo en el momento del parto porque existe la posibilidad pequeña pero real de seroconversión durante el periodo de atención prenatal. De esta manera, al obviar un segundo estudio, un número de niños nacidos de madres HIV positivas están en riesgo de contagio del virus a través de la alimentación a pecho. Además, en caso de que la seropositividad de la madre no se reconozca en el momento del parto, se anula la posibilidad de falta de infección del recién nacido a partir del tratamiento de la madre y del niño con AZT. El beneficio de conocer el estado de infección de la madre en el momento del parto también es ventajoso para ella, ya que puede comenzar a recibir terapia antirretroviral y profilaxis para las infecciones oportunistas en forma más temprana. La información puede ser útil también para asesorar a las mujeres en relación con la prevención de futuros embarazos o con la posibilidad de recibir cuidados prenatales tempranos en caso de una nueva gestación.

Sin embargo, para lograr el máximo beneficio del estudio serológico en el momento del nacimiento, debe estar garantizada la posibilidad de implementar todas las medidas correspondientes que surgen de la identificación del estado positivo, entre ellas la disponibilidad de AZT para ser administrado a la madre y al hijo. El sistema de rastreo debe estar disponible y el resultado debe ser rápidamente comunicado al profesional, de manera tal que el tratamiento con AZT pueda iniciarse con la mujer aun en trabajo de parto, con lo cual todavía hay tiempo de programar la cesárea y evitar la ruptura prematura de membranas.

Aun cuando el laboratorio no esté en condiciones de dar los resultados en forma tan rápida, disponer de ellos es ventajoso porque permite adoptar las medidas correspondientes para iniciar el tratamiento en el niño antes de las 48 horas posteriores al parto. Sin embargo, ningún procedimiento es de utilidad si no hay AZT disponible para administración intravenosa o en forma de jarabe. Por lo tanto, el rastreo serológico debe formar parte de un sistema organizado de cooperación entre el laboratorio, la farmacia y el equipo de obstetricia.

También hay que mencionar que en una proporción significativa de mujeres en quienes el estado de infección por HIV se descubre en el momento del parto (aquellas con escasa o nula atención prenatal), el diagnóstico es demasiado tardío como para obtener los máximos beneficios para el niño. El diagnóstico pudo haberse efectuado demasiado tarde como para obtener los beneficios de la terapia antirretroviral, para evitar la ruptura prematura de membranas y para programar la cesárea. Para la mayoría de estas mujeres, la evitación de la lactancia y el tratamiento del recién nacido son las únicas intervenciones posibles destinadas a reducir el riesgo de transmisión materno-fetal. Esto pone de manifiesto la enorme importancia de la educación de todas las mujeres embarazadas en relación con el valor del control prenatal temprano, especialmente para aquellas en riesgo de infección por el HIV. Asimismo, pone de relieve la necesidad de que las clínicas prenatales brinden la mayor posibilidad de atención, en relación con las horas de trabajo, el personal disponible y la localización. Cada mujer que no tiene posibilidad de acceso a un servicio de atención prenatal, ya sea por ignorancia o porque éste no está a su alcance, representa una fuente de contagio del HIV a su descendencia. Proporcionar la posibilidad de rastreo y tratamiento no es suficiente: los centros específicos deben asegurar el medio prenatal adecuado para que puedan obtenerse los máximos beneficios posibles.

Dr. Richard M. Grimes

B - O Diagnóstico de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Atualidades e Perspectivas



Augusto Simões-Barbosa

Columnista experto
Sociedad Iberoamericana de Información Científica

Función que desempeña: Profesor/pesquisador em Patologia molecular. Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasil

Otro trabajo de su autoría: Simões-Barbosa A, Abreu H, Silva Neto A, Gruss A, Langella P. A food-grade delivery

system for *Lactococcus lactis* and evaluation of inducible gene expression. *Applied Microbiol Biotechnol*, In press, 2003.

Doenças sexualmente transmissíveis, um problema mundial a ser enfrentado

Doenças sexualmente transmissíveis (DST) são causas importantes de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e vem experimentando aumento no registro de casos a partir da década de 1950 devido a um complexo de fatores da vida moderna. De maneira ilustrativa, ocorrem anualmente em todo o mundo 170 milhões de casos de infecções por *Trichomonas vaginalis*, 89 milhões por *Chlamydia trachomatis*, 62 milhões de casos de gonorréia, 12 milhões de sífilis, 30 milhões de condilomas anogenitais, 20 milhões de herpes anogenital e 2 milhões de cancroide. Atualmente, para a AIDS, estimam-se 30.6 milhões de casos.¹

Por exemplo, as infecções por *Chlamydia* e a sífilis são consideradas grandes fontes de morbidade e mortalidade, estando entre as quinze primeiras causas de incapacidade ou dano à saúde humana em populações urbanas.² Outro exemplo advém do câncer cervical, que tem sua etiopatogênese determinada pela infecção de subtipos carcinogênicos de HPV, e incidência de 500 000 casos/ano.³ Em média, a incidência de DST é sempre superior em pessoas entre a faixa etária de 15 a 35 anos, correspondendo em média ao período de maior atividade sexual, pertencentes a ambientes urbanos ou peri-urbanos. Nos países industrializados registra-se por ano um novo caso de DST em cada 100 pessoas, e nos países em desenvolvimento as DST estão entre as 5 principais causas de procura por serviços de saúde.¹ De fato, pobreza social e econômica são também adjuvantes de DST no contexto de países em desenvolvimento.⁴ Por exemplo, 80% da incidência e mortalidade do câncer uterino ocorre em países em desenvolvimento.³

Sem dúvida, a grave importância de DST na saúde pública foi acelerada pela epidemia da AIDS em todo o mundo. A literatura registra que o risco de infecção por HIV, vírus da imunodeficiência humana, aumenta de duas a cinco vezes sempre que as pessoas são portadoras de DST ulcerativas, não-ulcerativas e inflamatórias. Mesmo no último caso, micro-ulcerações, friabilidade da mucosa vaginal e um excesso de macrófagos e linfócitos (células hospedeiras do HIV), decorrentes da forte leucorréia, tornam-se adjuvantes para transmissão ou aquisição do vírus. Ainda, é sugerido que a diminuição da flora lactobacilar produtora de peróxido de hidrogênio permite maior sobrevivência do vírus no ambiente.⁵ De forma geral, associações epidemiológicas têm sido encontradas entre DST e infecção por HIV.⁶⁻⁸ Da mesma forma, o tratamento de populações na tentativa de combater as DST pode levar a redução no aparecimento de novos casos de infecção por HIV.⁹

Dados de nossos trabalhos prévios indicam uma situação alarmante para o caso das DST em nossa população, situação que parece ser comum a populações de países em desenvolvimento.⁴⁻⁶ Em um estudo longitudinal de 6 anos, foi preocupante notar a alta prevalência de lesões inflamatórias (65%), e que apenas uma pequena parcela de lesões pré-cancerosas e cancerosas (6%) correspondiam a lesões iniciais de categoria NICI (Neoplasia Intra-Cervical de grau I). Podemos inferir que grande parte das mulheres não atendem corretamente a prevenção ginecológica de câncer cervical, ou se fazem, os métodos de diagnóstico preventivo utilizados não são adequados a ponto de detectar as lesões iniciais.¹⁰

Na verdade, nos países em desenvolvimento, apenas 5% das mulheres atendem corretamente aos serviços de triagem do câncer cervical, enquanto que nos países desenvolvidos esse número alcança 40%. Este é um dos fatores importantes relacionados ao fato de que, em países em desenvolvimento, 80%-85% das mulheres com câncer cervical atendem à ginecologia em estágios incuráveis.^{11,12} Muitas devem falecer pela doença sem nunca terem sido atendidas pela clínica. Esse deve ser o quadro também para outras infecções e doenças sexualmente transmissíveis. No entanto, como pesquisadores da área em países em desenvolvimento, nós entendemos que não só a falta de informação é fator importante, mas também o difícil acesso, as condições precárias ao atendimento de saúde, e, por último, os métodos insuficientes de diagnóstico também participam da dificuldade do controle epidemiológico e de progressão dessas doenças nos indivíduos acometidos pelas infecções sexuais. A questão do diagnóstico, tema a ser tratado em especial neste trabalho, é ponto chave para o correto tratamento, aconselhamento e manejo das infecções sexuais.

O diagnóstico usual de doenças sexualmente transmissíveis

Ainda que os sintomas e os exames clínicos simples possam indicar a etiologia da doença, o diagnóstico de DST deve ser baseado em procedimentos laboratoriais, uma vez que essas análises primárias diretamente sobre o paciente tem baixa predição de acerto. Mesmo a colposcopia, considerada padrão ouro para lesões decorrentes de HPV, tem baixa especificidade (inferior a 50%), fato que leva a superestimação da infecção e lesão, e tratamento desnecessário, implicando em gasto e prejuízo psicobiológico e de saúde para o paciente.

A junção de elementos sintomatológicos e dados de exames clínicos permitiu a geração de poderosos algoritmos que podem facilitar o diagnóstico de DST. É a chamada abordagem sindrômica, que ainda assim não é satisfatória, pois os sintomas e os dados clínicos isolados ou em conjunto podem não permitir a distinção das doenças em muitos casos.¹³ Considerando as importantes resultantes patológicas de DST na população, o correto diagnóstico dessas doenças passa a ser crítico. Para que o atendimento ginecológico possa cuidar do adequado tratamento e prevenção de DST, prenatal e planejamento familiar e que, por sua vez, a vigilância alcance resultado satisfatório no controle de doenças tão importantes, um diagnóstico preciso ainda é necessário.

O diagnóstico laboratorial de DST é geralmente baseado em um minucioso exame microscópico das células e secreção colhidas por descamação exfoliativa ou abrasiva. O método citológico mais comum é denominado Papanicolaou, baseado na combinação de três corantes que resultam em tonalidades variadas e, dessa forma, permite a visualização de detalhes do núcleo e citoplasma das células fixadas. O Papanicolaou tem grande apelo ao uso uma vez que é possível distinguir a etiologia de diversas lesões inflamatórias e não-inflamatórias num único exame, o que agiliza o processo de leitura e diminui os custos.¹⁴ Isso torna o procedimento adequado para rotina



Información adicional en www.siiacsalud.com:
dirección de correspondencia, bibliografía completa, abstract,
full text, aprobación y patrocinio.

laboratorial em massa e triagem, e especialmente na alta rotina dos atendimentos públicos de saúde em grandes hospitais.

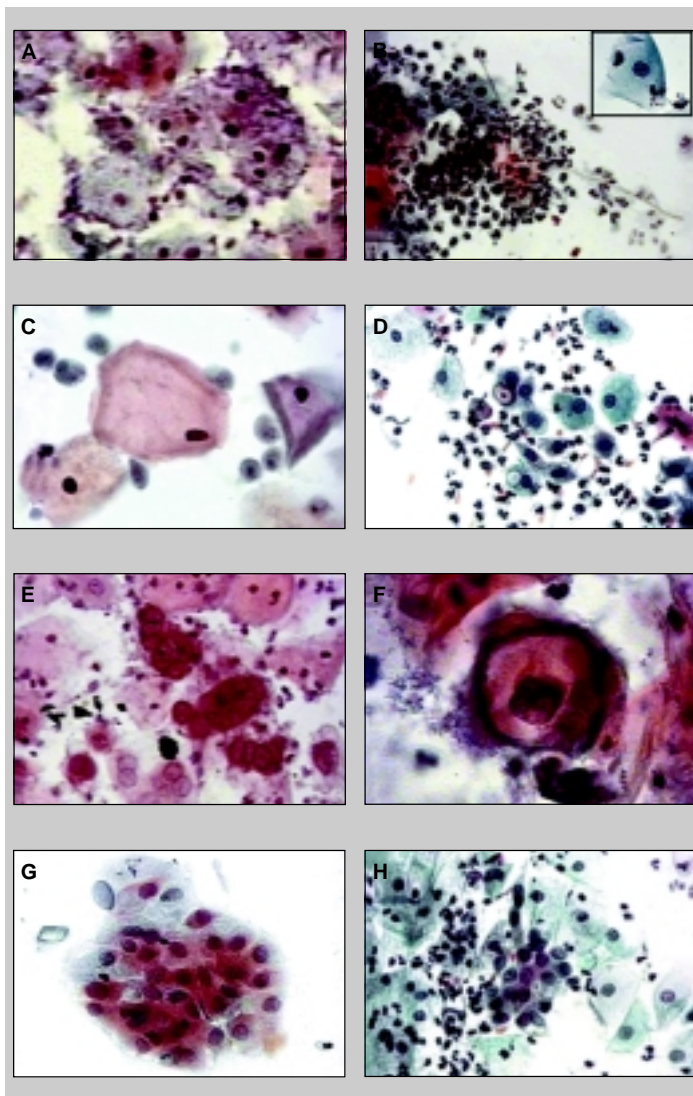
A citologia do Papanicolaou permite a distinção de diferentes etiologias inflamatórias e suas alterações citopatológicas, como *Trichomonas vaginalis*, micoses por *Candida* sp, viroses por Citomegalovírus (CMV), vírus da Herpes (HSV) e *Papillomavirus* humano (HPV), presença de bactérias pela flora lactobacilar, *Gardnerella vaginalis*, actinomicetos, *Klebsiella granulomatis* (sinon. *Calymatobacterium granulomatis*), *Chlamydia trachomatis*, *Leptothrix vaginalis*, e até cistos de amebas e ovos de helmintos.¹⁴ Em lesões inflamatórias, é notável a presença de um exsudato inflamatório composto por leucócitos e macrófagos, eventualmente hemáceas, uma vez que a friabilidade da mucosa vaginal pode levar ao fácil sangramento durante a coleta. No entanto, ressaltamos que este método citológico tem grande limitações e pode apresentar falhas consideráveis.¹⁵⁻¹⁷

Primeiro, deve-se ter em mente que pelo Papanicolaou não é possível a detecção segura de diversas infecções bacterianas, sendo necessário utilizar de técnicas de isolamento e cultura microbiológica. Para estes casos, vale citar: estafilococos, estreptococos, *Haemophilus ducrey* e *Neisseria gonorrhoeae*. Ainda mais, é notoriamente reconhecido que a cultura também é padrão ouro para *Candida* e *Trichomonas vaginalis*. O

T. vaginalis pode ainda ser bem observado, dada a motilidade do parasita e também a experiência do citologista observador, em um simples exame microscópico a fresco, desde que a observação seja feita imediatamente após a colheita ginecológica. Embora possível, a sensibilidade e especificidade do diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* são insatisfatórios pela citologia.¹⁸ Outra dificuldade advém da impossibilidade de cultivo acelular desta bactéria para diagnóstico. Daí, é necessário recorrer a técnicas imunológicas, assim como para detecção do *Treponema pallidum*. Este último ainda pode ser facilitado clinicamente quando há aparecimento do cancro. No entanto, na infecção treponêmica há uma ampla janela imunológica de até 3 semanas após o desenvolvimento do cancro, quando os testes imunológicos são pouco sensíveis. A microscopia em campo escuro é uma alternativa que necessita de equipamento especial, médicos e técnicos bem treinados, e ainda apresenta baixa sensibilidade sendo necessário no mínimo 10⁵ organismos/ml. O teste de infectividade em coelhos é padrão ouro para sífilis, de grande sensibilidade (até um único microorganismo), no entanto sendo necessário facilidades para manipulação de animais.¹⁹ Na infecção por *K. granulomatis*, embora restrita a focos tropicais, não há alternativa à citologia senão a detecção molecular.²⁰

A Figura 1 apresenta alguns resultados citológicos pelo Papanicolaou e revela os critérios definitivos para detecção de alguns agentes infecciosos genitais.¹⁴ A infecção por *Gardnerella vaginalis* é caracterizada pela presença de numerosos pequenos bacilos parcial ou totalmente aderidos na superfície das células que tornam-se de coloração azul clara. As células recobertas pelas bactérias assumem uma característica típica, e são denominadas *clue cells* (Figura 1A). *Candida albicans* é um fungo patogênico detectado em forma filamentosa ou de esporo. Filamentos marrom escuro ficam como galhos que se cruzam, enquanto que os esporos apresentam um halo claro devido a presença de uma parede celular bem delimitada. Essas características são definitivas para diagnóstico da candidíase genital (Figura 1B). O protozoário *Trichomonas vaginalis* possui uma forma elíptica, medindo cerca de 10 a 20 micrômetros, tomando tonalidade acinzentada a azulada. É usualmente encontrado próximo ou aderido às células epiteliais. Características definitivas devem ser a presença do núcleo periférico e traços do flagelo (Figura 1C). Porém, estas características podem tornar-se imperceptíveis.¹⁶ Por ser uma

Figura 1. Resultado de citologia pelo Papanicolaou. Verifique critério utilizados para diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* (A), *Candida* (B, detalhes de esporo no canto superior direito), *Trichomonas vaginalis* (C), *Chlamydia trachomatis* (D), HSV (E), HPV (F). Note as metaplasias atípicas, ASCUS (G) e AGUS (H), que se caracterizam por uma anormalidade celular moderada, alargamento do núcleo, hiper cromasia discreta e nucléolos evidentes, e que não deveriam ser confundidos com infecção por HPV ou lesões pré-cancerosas.



bactéria de vida intracelular obrigatória, a *Chlamydia trachomatis* é encontrada como inclusões eosinófilas preferencialmente nas células da região da junção escamocolunar e endocévice. Formam-se geralmente múltiplos vacúolos delimitados devido a formação de um verdadeiro vacúolo citoplasmático bem definido (Figura 1D).

As viroses são marcadas por alterações citológicas. O vírus da herpes genital (HSV) induz a megalia do núcleo, assim como a formação de células multi-nucleadas, aonde os grandes núcleos se justapõem. O núcleo também toma um aspecto vítreo característico, possuindo inclusões eosinófilas (Figura 1E). O HSV pode atingir e formar lesões nas camadas de células malpighianas, metaplásicas e endocervicais.^{14,21} Células infectadas pelo *Papillomavirus* humano (HPV) desenvolvem atípicas, muitas vezes discretas. A coloitose é predominante. Refere-se ao alargamento do núcleo (relação núcleo/citoplasma alterada) o qual torna-se envolvido por um halo citoplasmático claro e em forma côncava (Figura 1F). O colo do útero, em especial a zona de transformação, é o local preferencial de infecção pelo HPV e de potencial oncogênico. Ressalta-se que a

citologia não permite a distinção entre os subtipos de HPV.

Dada a relação oncogênica da infecção pelo HPV, este é o ponto mais crítico em termos de diagnóstico de DST na atualidade. A infecção com HPV pode ser confundida com processos neoplásicos ou apenas metaplásicos.^{14,15,21} As anormalidades citológicas de baixo grau identificadas como ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e AGUS (células glandulares atípicas de significado indeterminado) são muitas vezes mau interpretadas por limitações técnicas (Figura 1G e 1H).

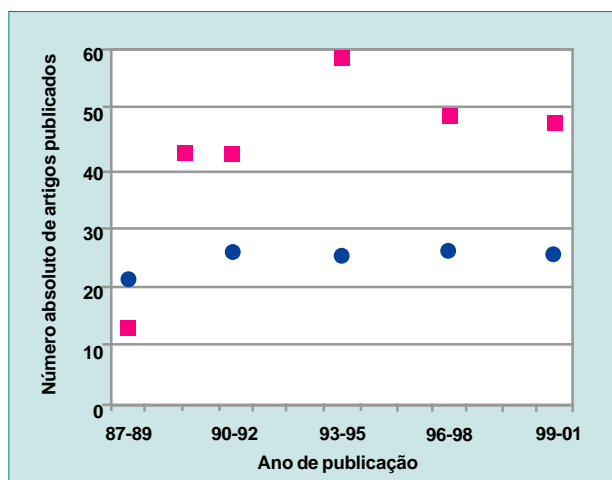
Há enorme subjetividade na interpretação destas atipias celulares, fato que se traduz na variabilidade de resultados inter-observador ou entre diferentes laboratórios.²² Esta subjetividade leva, na maioria dos casos, a uma super-estimação do diagnóstico, tratamento desnecessário e estresse emocional para a paciente. Isso encarece os custos do rastreamento, pois estas mulheres serão submetidas a exames complementares e a uma rotina mais freqüente de visita ginecológica.

Os dados a seguir mostram o quão conflitante é o diagnóstico do HPV e lesões cervicais versus atipias celulares. É certo que 10%-15% das mulheres com ASCUS tenham na verdade lesões de alto grau ou câncer. Também, mais da metade das lesões de alto grau são precedidas por diagnóstico citológico de ASCUS ou AGUS.^{3,23} O erro intrínseco da técnica do Papanicolaou é da ordem de 20%-30%, sendo que um exame único pode não evidenciar lesões precursoras de câncer cervical em até 50% dos casos positivos.²³ A citologia quando repetida tem uma sensibilidade máxima de 75%,^{24,25} e a colposcopia, embora mais sensível para detectar lesões de alto grau do que a citologia, apresenta um grade erro entre falso-positivos que pode alcançar a marca estratosférica de 55%.²⁶

Um alerta: no milênio do genoma, para onde vamos?

As pesquisas genômicas em todo o mundo estão mostrando as identidades genéticas de vários microorganismos patogênicos ao homem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/index.html>; www.tigr.org). Uma aplicação óbvia da pesquisa genômica é apontar alvos, ou seqüências de DNA, para diagnóstico molecular. Na verdade, uma enorme quantidade de trabalhos a respeito de diagnóstico molecular têm sido produzidos na última década (Figura 2). Embora, alguns avanços práticos tenham sido obtidos, pode-se esperar ainda muitas aplicações que venham a melhorar a eficiência do diagnóstico em DST.

Figura 2. Número absoluto de artigos publicados por triênios desde 1987 até 2001, obtido em base de dados do *PubMed*, *National Library of Medicine*, *National Institutes of Health*, NIH, EUA (www.ncbi.nlm.nih.gov). Bola azul, número de artigos vezes 1.000 buscado pelas seguintes palavras-chaves: *std AND diagnosis*. Quadrado rosa, número de artigos vezes 10 buscado pelas seguintes palavras-chaves: *std AND molecular AND diagnosis*. Subentende-se *std* como abreviatura de *Sexually Transmitted Diseases*.



O diagnóstico molecular é baseado no uso de sondas de DNA que tenham total identidade ou grande similaridade de seqüência a uma pequena e conservada parte do genoma do organismo que se pretende detectar, geralmente um gene ou uma pequena seqüência de um gene deste organismo. Para tanto, geralmente busca-se uma seqüência altamente conservada no organismo alvo, os chamados *house-keeping genes* (HKG) ou ainda seqüências de RNA ribossômico. Os HKG são genes que fazem parte dos eventos metabólicos básicos, como enzimas da via glicolítica clássica, ou genes que codificam proteínas estruturais, como a actina formadora do citoesqueleto. Desta forma, em qualquer situação metabólica, ou em todos os isolados clínicos de qualquer parte do mundo, espera-se que estes genes estejam representados no genoma do microorganismo em questão. As seqüências de RNA ribossômico apresentam ainda a vantagem de estarem representadas em repetidas cópias no genoma, o que geralmente aumenta a sensibilidade analítica da detecção, podendo detectar um pequeno número do organismo alvo. Por serem altamente conservados, é necessário avaliar a especificidade clínica, ou seja a capacidade da sonda em não apenas detectar o patógeno mesmo que em pequena quantidade (o que é útil em amostras escassas), mas também discriminá-lo de outros possíveis microorganismos de similaridade filogenética ou que simplesmente compartilhem o mesmo ambiente.

Algumas derivações de técnicas especiais de biologia molecular têm sido adaptadas para o uso em diagnóstico (Tabela 1).

Essencialmente, todas elas têm como base a hibridização do DNA e a amplificação do DNA pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia ou PCR. A PCR é uma técnica poderosa que permite a amplificação exponencial de um pequeno trecho de DNA limitado pelo par de sondas que o usuário utiliza. Assim, obtêm-se grandes quantidades de DNA amplificado, sendo possível detectar a presença do DNA de um organismo mesmo que a amostra seja escassa ou a parasitemia seja ínfima. Essa é a grande vantagem da PCR sobre a hibridização de DNA. No entanto, a PCR convencional necessita de análise em eletroforese com equipamentos e corantes especiais e tóxicos. Também, a sua interpretação para o diagnóstico baseado na presença ou ausência de DNA amplificado pode ser subjetiva. Ainda, dada a sua enorme sensibilidade, cuidados adicionais quanto a contaminação entre amostras deve ser levado em conta, até mesmo a separação física do ambiente, do equipamento e dos manipuladores.

A conjugação da PCR e hibridização levou a elaboração de técnicas mais refinadas, com maior sensibilidade, através do uso de uma sonda interna ao DNA amplificado mais específica que permite maior objetividade na interpretação do resultado e até a tipagem do organismo alvo. A hibridização tem evoluído no sentido da marcação das sondas com compostos não-radioativos que para as técnicas derivadas, como a PCR-Dot blot, PCR-ELISA e os *chips* de DNA, não comprometem a sensibilidade analítica. Em termos de DST, a possibilidade de tipagem do organismo alvo fez a PCR-Dot blot e PCR-ELISA serem implementadas para diagnóstico de tipagem do HPV.^{24,27,28} A PCR-ELISA tem vantagem por sua maior automação, e também tem demonstrado sensibilidade superior que a hibridização em Dot blot.²⁷ O fato de não utilizar eletroforese e adaptar a detecção do produto amplificado em um leitor de ELISA é um atrativo a mais, também sendo possível a tipagem do organismo em escala e rapidez considerável. Os *chips* de DNA²⁹ são novidades tecnológicas com o mesmo princípio de hibridização, porém em pequeno volume e em grande escala, com capacidade analítica para mais de 100 mil reações simultaneamente. Seu uso restringe-se à pesquisa genômica, assim como o sequenciamento de DNA.

A PCR-Multiplex utiliza mais de um par de sondas em uma única reação. Teoricamente, não há limites para o número de sondas a se utilizar em uma reação de PCR, suprindo-se dos substratos. Este fato é extremamente interessante quando pensamos em detectar infecções simultâneas, ou microorganismos de relação etiopatogênica que compartilhem o mesmo hábitat. Em termos de DST, alguns sistemas interessantes de PCR-

Tabela 1. Considerações sobre metodologias adaptadas ao diagnóstico molecular.

Técnicas de Biologia Molecular adaptáveis ao diagnóstico molecular		
Técnica	Considerações	Aplicação ao diagnóstico molecular
1. Hibridização de DNA genômico (Southern blot)	Necessidade de grandes quantidades de amostra, marcação especial de sonda. Suprimentos: eletroforese, sistema de blot e forno especial de hibridização.	SIM.
2. Hibridização ou PCR <i>in situ</i>	Necessidade de pouca quantidade de amostra, mas excelente grau de conservação e limpeza, marcação especial de sonda. Suprimentos: termociclador (p/ PCR), forno de hibridização (p/hibridização), microscópio de imunofluorescência.	SIM.
3. PCR convencional	Necessidade de pouca quantidade de DNA, estrutura laboratorial especial para impedir contaminação de amostra, interpretação em gel pode ser subjetiva. Suprimentos: termociclador, sistema de eletroforese e transluminador de UV.	SIM.
4. RAPD	Idem ao item 3, trata-se de amplificação de DNA por PCR utilizando sondas aleatórias. Reservada à pesquisa de polimorfismo genético	NÃO, reservada à pesquisa.
5. PCR-RFLP	Idem ao item 3, trata-se da partição do DNA amplificado por enzimas especiais, enzimas de restrição. Permite a tipagem ou a pesquisa de polimorfismo genético.	SIM.
6. PCR-Multiplex	Idem ao item 3, trata-se da utilização de mais de um par de sondas na PCR. Interessante por permitir a detecção simultânea de mais de um patógeno.	SIM.
7. PCR-Dot blot	Trata-se da hibridização do DNA PCR-amplificado por sondas internas específicas, daí maior objetividade no resultado que PCR convencional, resultado semi-quantitativo. Suprimentos e necessidades do item 1 e 3, porém sistema de eletroforese e transluminador de UV dispensáveis.	SIM, permitindo tipagem.
8. PCR-ELISA	Trata-se de PCR e hibridização em placas de ELISA, com marcação especial de sondas, por isso, maior praticidade e adequação para rotina laboratorial. O resultado pode ser semi-quantitativo. Suprimentos resumidos em termociclador, forno simples p/hibridização e leitor de ELISA.	SIM, permitindo tipagem e semi-automação.
9. Captura híbrida	Sistema semi-automatizado de hibridização em placas, sem amplificação prévia do DNA. Princípio semelhante a detecção por ELISA, sendo o resultado semi-quantitativo. Tecnologia patenteada pela <i>Digene</i> e todos suprimentos são exclusivos para a execução da captura híbrida apenas.	SIM, limitado a HPV (tipagem), CMV, e <i>Chlamydia trachomatis</i> .
10. PCR-sequenciamento	Idem ao item 1. Trata-se da obtenção direta da seqüência do DNA amplificado por sequenciamento automático. Suprimentos: necessidades do item 3 com adição do sequenciador automático, hardware e software especializados.	Não, reservada à pesquisa.
11. <i>Chip</i> de DNA	Trata-se da hibridização de DNA em pequeno volume e larga escala. Suprimentos: todas as necessidades do item 8, com adição de manufaturador e hibridizador robotizado de <i>chips</i> , hardware e software especializados	Não, reservada à pesquisa.

Multiplex têm sido desenvolvidos para detecção simultânea de: *Gardnerella vaginalis* e *T. Vaginalis*;³⁰ *T. pallidum*, *H. ducreyi* e HSV;³¹ *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.³²⁻³⁴ Como muitas DST têm hábitat delimitado ou predominante no ambiente cervicovaginal, o desenvolvimento de sondas para PCR-Multiplex têm um grande apelo para o elaboração de kits simples de diagnóstico múltiplo, por isso mais rápidos e de menor custo. Ainda mais, com a maior facilidade técnica e praticidade da PCR-ELISA, seria um grande avanço o desenvolvimento de um sistema robusto de PCR-Multiplex conjugado a PCR-ELISA para o diagnóstico simultâneo de DST e tipagem do HPV.

Não há dúvidas de que o diagnóstico molecular aumenta substancialmente a eficiência da detecção da infecções genitais, seja qual for a natureza da infecção e a técnica de diagnóstico padrão implementada.^{16-18,20,35-43} Não obstante, as técnicas convencionais de citologia, microbiologia e imunologia, ainda que insatisfatórias, serão sempre o método de escolha até que haja a elaboração de metodologias que, além de serem mais sensíveis e específicas, também demonstrem ser rápidas, de fácil execução, de grande processividade e de baixo custo. Neste contexto, uma das linhas de pesquisa de nosso grupo é o desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico para DST, o qual procuramos parceiros da iniciativa privada que tenham interesse em investir recursos para desenvolvimento de tecnologia nacional na elaboração de um kit diagnóstico.⁴⁴

As novas tecnologias de diagnóstico baseadas na detecção do DNA do patógeno têm evoluído neste sentido. O exemplo mais claro disso resultou em um produto de diagnóstico de HPV comercialmente disponível que tem atualmente grande uso, a captura híbrida (*Digene Diagnostics*, Inc.). Através de um conjunto de sondas para os diferentes tipos de HPV, a captura híbrida permite a detecção semiquantitativa da carga viral e tipagem entre HPV de baixo risco (tipos 6, 11, 42, 43 e 44) e de alto risco oncogênico (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56). Interessante do processo é a sua automação, facilitando o laboratorista.

O diagnóstico molecular do HPV traz à superfície um dilema: como, e a que nível aplicar esta tecnologia na rotina clínica.

Trabalhos prospectivos que levam em consideração a idade da paciente, a chance de infecção por HPV, a necessidade e os custos de exames e tratamentos adicionais, a perda produtiva e estimativa de vida mostram que haveria redução de custos da ordem de 20%-30% utilizando a captura híbrida como forma de triagem.³ Esses resultados podem refletir uma tendenciosidade econômica em prol do consumo da tecnologia de captura híbrida, por outro lado impõem uma limitação prática ao uso da captura híbrida como rotina de diagnóstico, em especial para países em desenvolvimento: o custo.

A empresa norte-americana *Digene* detém a patente da captura híbrida. O equipamento, tipo fluorômetro, é desenhado para uso exclusivo da captura, não tendo outro proveito laboratorial. Os kits de diagnóstico são caros, embutidos no valor os *royalties* e as taxas de importação. A realidade dos países em desenvolvimento, somado aí as questões políticas e socio-econômicas, não permitem a utilização da captura híbrida em larga escala no sistema público de saúde. Então, o diagnóstico pela captura híbrida fica restrito aos convênios privados de saúde.

Em tempos em que a Ciência avança a passos largos, e o Brasil incluído como um dos grandes líderes mundiais nas Ciências do Genoma, o que podemos esperar desse conhecimento em termos de aplicação e benefício sociais, uma vez que o país sofre com grandes desigualdades socio-econômicas? É certo que não falta competência e conhecimento científico por parte dos pesquisadores pertencentes aos países em desenvolvimento. A questão passa por políticas públicas que priorizem o investimento em pesquisa nacional. Afinal, com incentivo do governo, temos capacidade de desenvolver nossos medicamentos e tecnologias de diagnóstico. Estamos certos de que o custo social será inferior ao que o país desembolsa para o pagamento de *royalties*, importação de medicamentos e tecnologias de diagnóstico.

C - Metilación del Gen ER en el Carcinoma Endometrial



Tanri Shiozawa*

Columnista experto

Sociedad Iberoamericana de Información Científica

Función que desempeña: Profesor asociado, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Escuela de Medicina de la Universidad Shinshu, Asahi, Japón.

Otro trabajo de su autoría: Kato K, Shiozawa T et al. Expression of the mitogen inducible gene-2 (mig-2) is elevated in human uterine leiomyomas but not in

leiomyosarcomas, *Human Pathology* 35:55-60, 2004.

*En colaboración con los doctores Toshio Nikaido e Ikuo Konishi.

Introducción

El carcinoma endometrial es la neoplasia invasora más común del tracto genital femenino y es la séptima causa de muerte por patologías oncológicas. Cerca de 39 300 nuevos casos se diagnostican anualmente, con un resultado de más de 6 600 muertes en los EE.UU.¹ La cantidad de pacientes con carcinoma endometrial ha crecido en Japón de modo constante en los últimos años, por lo cual la comprensión de las características biológicas desde tumor es cada vez más importante. El carcinoma endometrial es un típico tumor hormonodependiente, y se cree que las hormonas esteroides ejercen un importante papel en la patogénesis y desarrollo tumorales.^{2,3} Dado que estos fenómenos vinculados a las hormonas son evocados a través de sus receptores específicos, es importante explorar los patrones y mecanismos de expresión de los receptores esteroides. Se ha señalado que los receptores estrogénicos (ER) se expresan ampliamente en las glándulas endometriales proliferativas normales, pero que se encuentran inhibidos en un subgrupo de carcinomas endometriales.⁴⁻⁸ La pérdida de la expresión ER en el carcinoma endometrial se relaciona con la independencia de la regulación hormonal, la refractariedad a las terapias hormonales, y se comporta como marcador de subtipos clínicamente agresivos.⁴⁻⁸ Así, es imperioso investigar los mecanismos inhibitorios de los receptores esteroides. Recientes estudios revelaron que la metilación de las citosinas ubicadas en las islas CpG (CpGs; área rica en citosina y guanina), localizadas en el promotor de varios genes, se encuentra profundamente involucrada en la supresión de la transcripción génica.⁹⁻¹¹ En el presente artículo se revisan estudios acerca de la correlación entre la expresión del ER y la metilación del gen ER para comprender los mecanismos inhibitorios de este receptor en el carcinoma endometrial.

Crecimiento inducido por estrógenos y supresión del crecimiento inducida por progestágenos en el endometrio normal y en el carcinoma endometrial

El crecimiento de las glándulas endometriales humanas es controlado estrictamente por los estrógenos y la progesterona.¹² Los estrógenos estimulan la proliferación de las células glandulares y estromales, mientras que la progesterona suprime el crecimiento e induce cambios secretorios de las células glandulares, provocando —además— cambios deciduales en las células del estroma. Se piensa que estos cambios son llevados a cabo a través de sus receptores específicos.¹² El mecanismo de crecimiento inducido por los estrógenos ha sido investigado en términos de simulación de la expresión del ER,^{13,14} de enzimas metabolizadoras de estrógenos¹⁵ y de mecanismos autocrinos/paracrinos mediados por factores de crecimiento.⁶ Sin embargo,

no se sabe mucho acerca de los mecanismos intercelulares que promueven directamente el crecimiento celular en el endometrio normal. Nosotros examinamos el mecanismo de crecimiento inducido por estrógenos en las glándulas endometriales normales respecto de los reguladores del ciclo celular, dado que las expresiones e interacciones de las moléculas vinculadas con el ciclo celular, tales como las ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (cdks) y los productos del gen supresor de tumores, son esenciales para la progresión del ciclo celular.^{17,18} Nosotros mostramos que los estrógenos inducían la expresión secuencial de ciclinas en las células glandulares endometriales normales cultivadas; por ejemplo, la expresión de la ciclina D1 fue observada por primera vez 4 horas después de la estimulación con estradiol (E2) y fue seguida serialmente por la expresión de las ciclinas E, A y B1. Además, la estimulación inducida por E2 de la ciclina D1 fue mediada por c-Jun. En las células de carcinoma endometrial ER-positivo (Ishikawa), se observó también la estimulación inducida por E2 de la ciclina D1, pero ella fue mediada por mecanismos distintos de aquellos presentes en las glándulas endometriales normales. Además, nosotros demostramos que la supresión del crecimiento inducida por progesterona de las glándulas endometriales normales y las células PR-positivas del carcinoma endometrial (células de Ishikawa) es mediada por un inhibidor cdk, p27.^{19,20}

Subtipos ER y PR y sus expresiones en el endometrio normal y el carcinoma endometrial

Los ER tienen dos isoformas funcionales, ER alfa y ER beta. Los genes para el ER alfa se encuentran localizados en el locus cromosómico 6p25.1^{21,22} y los genes del ER beta en el cromosoma 14q22-24.²³ En el endometrio normal se observa que la expresión del ER alfa es predominante respecto de la del ER beta.²⁴⁻²⁶ En la fase proliferativa, casi todas las células glandulares expresan ER alfa, mientras que su expresión disminuye en la fase secretoria. El porcentaje de células positivas para ER alfa en las fases secretorias temprana, media y tardía es aproximadamente de 30%, 5% y 1%.^{13,27} En contraste, la expresión del ER beta se observa principalmente en las células glandulares, pero su localización e intensidad son limitadas.²⁴⁻²⁶ Se cree que la disminución de la expresión del ER alfa en la fase secretoria obedece al aumento de los niveles séricos de progesterona¹² aunque, sin embargo, los mecanismos de la inhibición inducida por progesterona del ER alfa no son completamente comprendidos. Se considera que la más importante función del ER alfa es la estimulación de la proliferación celular, tanto en el endometrio normal como maligno,¹² mientras que la función del ER beta en el endometrio no se comprende. Los receptores para la progesterona (PR) tienen también dos isoformas principales, PR-A y PR-B.^{28,29} Estas dos formas son expresadas por un único gen y son consecuencia de la transcripción de promotores diferentes.^{28,29} PR-A y PR-B se expresan en cantidades aproximadamente iguales en los tejidos endometriales.^{30,31} En las glándulas endometriales normales, el patrón de expresión de PR-A y PR-B es similar al del ER alfa; por ejemplo, la mayoría de las células glandulares son positivas para PR-A y PR-B en la fase proliferativa, pero la expresión de ambos se encuentra marcadamente disminuida en la fase secretoria.^{27,30} La función del PR-B ha sido extensamente estudiada en varias células; sin embargo, los estudios acerca del PR-A son limitados.

Se ha descrito la expresión de ER alfa y ER beta en carcinomas endometriales.^{32,33} La expresión del ER alfa, que es positiva en la mayoría de las células glandulares del endometrio proliferativo normal, se encuentra a menudo preservada en el carcinoma endometrial, especialmente en los tumores de bajo grado histológico. Por otra parte, la expresión del ER alfa se pierde en la mayoría de los carcinomas de alto grado. Además, aun en tumores de bajo grado con expresión ER alfa, la expresión de

este último tiende a ser suprimida durante la progresión del tumor.^{2,8} La falta de expresión del ER alfa en el carcinoma endometrial es clínicamente importante, dado que los tumores ER alfa negativos son refractarios a las terapias hormonales, crecen rápidamente y se caracterizan por los pobres resultados clínicos que logran las pacientes, en comparación con los tumores ER alfa positivos.⁸ Se ha comunicado la expresión del ER beta en el carcinoma endometrial. Utsunomiya y colaboradores informaron que puede observarse expresión de ARNm para ER beta en aproximadamente 36% de los tejidos carcinomatosos endometriales examinados; sin embargo, no existieron correlaciones con los marcadores decrecimiento y los parámetros clínico-patológicos.³² Takama y colaboradores informaron que la elevación de la tasa ARNm para ER beta/ARNm para ER alfa correlacionaba con la invasión miometrial.³³ Sin embargo, a diferencia del ER alfa, el patrón de expresión y la significación del ER beta no han sido completamente establecidos.

Compromiso de la metilación de las islas CpG en la regulación de la transcripción génica

La región promotora y ciertos genes a menudo contienen áreas ricas en citosina y guanina, llamadas islas CpG (CpGs). La metilación de la citosina, especialmente en las CpGs, produce la supresión de la transcripción del gen.^{9,10} Debido a que esta supresión es producida sin alteración alguna de las secuencias de ADN, tales como mutaciones y deleciones, este cambio es llamado epigenético.^{34,35} Se comunicó la metilación de los promotores en varios genes. Los receptores esteroideos tales como ER, PR y los receptores androgénicos son moléculas representativas cuya expresión es susceptible de regulación por metilación CpG de sus propios genes.^{36,37} Los reguladores del ciclo celular son también blancos de la metilación CpG. Se informó la reducción de la expresión de los promotores inducida por la metilación del producto del gen del retinoblastoma (Rb; un importante supresor tumoral) en retinoblastomas.³⁸ Se señaló la pérdida de p16^{INK4}, un inhibidor de las quinasas dependiente de ciclinas (cdk), a través de la metilación del promotor, en neoplasias ginecológicas, especialmente en carcinomas endometriales y cervicales avanzados.³⁹ Se informó también la reducción de la expresión de la ciclina D1, un regulador positivo de la fase G1, debido a la metilación del promotor, en la capa basal de las células uterinas de ratas; esto podría explicar el limitado potencial de crecimiento que muestra la capa basal del endometrio.⁴⁰ Además, la expresión del gen hMLH1, un gen reparador de errores de concordancia en el ADN, es regulada por metilación del promotor.^{41,42} Se sabe que la hipermetilación del gen hMLH1 reduce la expresión del ARNm y la proteína para hMLH1; ello produce aumento de la inestabilidad del microsátelite, lo cual puede ser un evento temprano de la carcinogénesis endometrial.

Se piensa que la metilación de CpGs es mediada por ADN metiltransferasas,^{43,44} varios subtipos de estas enzimas han sido identificados. Las metiltransferasas 3a y 3b poseen potentes actividades metilatorias *de novo*, mientras que la metiltransferasa 1 tiene una función de «mantenimiento» de la metilación más poderosa, en comparación con la actividad de metilación *de novo*.^{45,46} Sin embargo, aún deben dilucidarse las especificidades de sustrato y los mecanismos regulatorios de estas metiltransferasas. La supresión de la transcripción inducida por metilación es atribuida a la metilproteína de unión a la citosina (MeCPI), a las citosinas metiladas y a los subsiguientes cambios conformacionales que inhiben la transcripción.⁴⁷⁻⁴⁹ Se ha dicho que la supresión de la transcripción correlaciona con la densidad de metilación de las CpGs.^{48,49}

Promotor del gen ER y detección de la metilación del gen

Respecto de la estructura del promotor del gen ER, el ADN promotor del ER alfa humano abarca desde +163 (desde el punto inicial de transcripción) hasta -15 kb cadena arriba del

gen ER alfa,⁵¹⁻⁵² y esta área contiene al menos siete regiones promotoras (llamadas A, B, C, D, E, F y T). Se ha descrito también la utilización de promotores específicos de los tejidos. Por ejemplo, se ha comunicado la utilización de los promotores A (que abarca desde +1 hasta +163), B (-170 hasta -321), y C (-1 859 hasta -3 067) en células de carcinoma endometrial.^{53,54} Más de 60 sitios CpG fueron identificados junto con estas tres regiones promotoras. Además de estas últimas, existen varios sitios CpG localizados en un área que abarca desde +290 hasta +490 en la región modificadora del exón 1.⁵⁰ Es importante destacar que los sitios CpG localizados en esta área se encuentran incluidos en secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción específicas de metilación tales como *Hha1* y *HpaII*.

Se desarrollaron varias técnicas para detectar la metilación de las islas CpG en la última década. En los comienzos de los '90, la detección de la metilación del gen ER era llevada a cabo por enzimas de restricción sensibles a la metilación, tales como *Hha1* y *HpaII*, en combinación con el análisis por *Southern blot*. Las enzimas de restricción específicas de metilación, tales como *Hha1* y *HpaII* logran que, cuando las citosinas ubicadas en CpG y localizadas en puntos de clivaje específicos de las enzimas son metiladas, la enzima no puede cortar el ADN. Así, el patrón de digestión del genoma ADN por parte de estas enzimas difiere entre aquellas que contienen citosina metilada y citosina no metilada en los CpG ubicados en los sitios de reconocimiento. La diferencia del ADN luego de la digestión fue detectada mediante prueba de *Southern blot*. La metilación del gen ER fue ampliamente estudiada en carcinomas mamarios utilizando esta técnica. Piva y colaboradores describieron la difusa hipometilación del terminal 5' del gen en carcinomas mamarios con alto contenido de ER, e hipermetilación en carcinomas sin ER.⁵⁵ Ottaviano y colaboradores demostraron que las líneas celulares de carcinoma mamario negativas para ER alfa poseen mayor capacidad para metilar ADN, y que muestran amplia metilación de las islas CpG en la región 5' del promotor del gen ER, lo cual correlacionaba con el silenciamiento de la expresión del ER.⁵⁶ Lapidus y colaboradores señalaron que las islas CpG ubicadas en la región 5' del ER se encontraba metiladas en tumores ER negativos, pero no estaban metiladas en los ER positivos.⁵⁷ Pese a que esta técnica es racionalmente simple, requiere cantidades relativamente grandes de ADN, y la experimentación utilizando secciones de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina es dificultosa. Para resolver este problema, nosotros desarrollamos un método para detectar la metilación de una isla CpG localizada en la secuencia de clivaje de la enzima de restricción en el exón 1 (+290 hasta +490), utilizando digestión por enzimas de restricción sensitivas a la metilación, y la siguiente reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁵⁸ Esta técnica requiere cantidades relativamente pequeñas de ADN genómico, lo cual permitió analizar la metilación en especímenes *in vivo* extraídos de secciones de tejido embebidas en parafina. Además, se aplicaron recientemente varias técnicas utilizando bisulfito de sodio y el siguiente secuenciamiento directo, o técnicas PCR específicas para metilación. En estos métodos, el ADN genómico fue tratado primero con bisulfito de sodio, lo cual cambia la citosina no metilada a timidina, pero no la citosina metilada. Los cambios en la secuencia inducidos por el bisulfito de sodio fueron detectados por la siguiente secuencia directa.

Esta técnica permitió detectar metilaciones CpG existentes en amplias regiones del ADN genómico; sin embargo, el procedimiento de secuenciamiento demanda mucho tiempo y esfuerzo. Para mejorar esta limitación, se desarrolló un tratamiento con bisulfito de sodio seguido de técnicas de PCR específicas para metilación.⁵⁹ En esta técnica, la PCR fue realizada utilizando iniciadores diseñados para reconocer específicamente citosina metilada o timidina originadas por el tratamiento con bisulfito. Esto permitió examinar la metilación en varios sitios con menos trabajo experimental, y ha sido ampliamente utilizada en este campo debido a su relativa

simplicidad técnica. Sin embargo, este método tiene limitaciones en cuanto al diseño de iniciadores específicos, así como en cuanto a su capacidad para detectar metilación sólo en las CpGs de los sitios iniciadores. Archery y colaboradores informaron, en carcinomas mamaros, el aumento de la metilación CpG del gen ER en cánceres mamaros ER-negativos vinculados al BRCA-1, utilizando técnicas PCR metilación-específicas.⁶⁰

Metilación del gen ER y su correlación con la expresión ER en el carcinoma endometrial

Nosotros investigamos la metilación de las islas CpG localizadas entre +290 y +490 en el exón 1 del gen ER alfa en células endometriales (Ishikawa) ER alfa-positivas y en líneas celulares de carcinoma mamario (MCF-7), utilizando la técnica antes mencionada.⁵⁸ Los resultados indicaron que las citosinas no se encontraban metiladas en los sitios de reconocimiento de *Hha1* y *HpaII* de las islas CpG de estas células. Por el contrario, ambos sitios se encontraban metilados en las líneas celulares de carcinoma endometrial ER alfa-negativas (KLE) y de cáncer mamario (MDA-MB-231). Luego examinamos tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, obtenidos de 25 casos de carcinoma endometrial; se halló metilación del gen ER alfa en el sitio *HpaII*, o en ambos sitios *Hha1* y *HpaII* en 6 casos, mientras que no se halló metilación en los restantes 19 casos.

Histoquímicamente, 5 de los 6 casos con metilación fueron negativos para la expresión del ER alfa, mientras que 14 de los 19 casos sin metilación fueron positivos para el ER alfa ($p = 0.02$). Así, nosotros concluimos que la metilación de las islas CpG del gen ER alfa se correlaciona inversamente con la expresión ER alfa en el carcinoma endometrial.

Respecto de la expresión ER y la metilación génica en los carcinomas endometriales, Hori y colaboradores informaron el estado de metilación de dos regiones promotoras del gen ER alfa y la expresión de proteína ER alfa.⁵³ Ellos estudiaron la metilación de los sitios *HpaII*, *NotI* y *SacII* en la región promotora distal a la cual corresponde el antes mencionado promotor B del ER alfa, y la misma región del exón 1, tal como examinamos nosotros. Ellos mostraron que la metilación del sitio *HpaII* en ambas áreas se encontraba presente en 13 de 38 carcinomas endometriales, mientras que no se identificó metilación en los sitios *NotI* y *SacII*. Ellos concluyeron que la metilación del gen ER alfa no se correlacionaba con expresión ER alfa en los carcinomas endometriales. Sin embargo, los autores no examinaron la presencia o ausencia de metilación en el sitio *HhaI*, que podría ser importante para la represión de la expresión ER. Evaluaron la expresión del ER por ensayo inmunoenzimático utilizando muestras de tejido homogeneizadas, las cuales podrían haber producido falsos positivos debido a contaminación de células ER-positivas, estromales o miometriales.

Navari y colaboradores estudiaron también la correlación entre la metilación del gen ER alfa y la expresión de la proteína ER utilizando varias técnicas PCR específicas de metilación y tratamiento con bisulfito de sodio.⁶¹ Examinaron la amplia metilación de una región de 600-bp en el terminal 5' del gen ER alfa, en ADN extraído de dos líneas celulares de carcinoma endometrial ER alfa-negativas (KLE y Hec-1-A) y en ADN microdisecado de tejidos de carcinoma endometrial fijado en formalina y embebido en parafina, en los cuales la expresión ER había sido confirmada como negativa por inmunotinción. Los resultados indicaron que las dos líneas celulares de carcinoma endometrial ER alfa-negativas mostraban extensos sitios de metilación en el área 5' del gen ER, las cuales incluían los mismos sitios CpG examinados por nosotros. Este resultado fue consistente con nuestro resultado, lo que sugiere que la metilación del gen ER alfa funciona como un represor *in vivo* de la transcripción. Sin embargo, ninguna de las 55 CpGs se encontraba metilada en los carcinomas endometriales ER alfa-negativos ni en el endometrio normal ER alfa-positivo. Este resultado sugiere que el estado de metilación no afecta la expresión del ER alfa en el carcinoma endometrial *in vivo*.

Sasaki y colaboradores informaron correlación entre el estado de metilación de tres promotores ER alfa (ER alfa-A, alfa-B y alfa-C, como fue descrito previamente), y entre el estado de metilación del promotor ER beta y la expresión de los correspondientes transcritos, por ejemplo, el ARNm para ER alfa-A, alfa-B, alfa-C y ER beta, en líneas celulares de carcinoma endometrial ER alfa positivos, y en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, utilizando PCR específica de metilación y RT-PCR.⁵⁴ Ellos informaron que, en las líneas celulares de carcinoma endometrial, la expresión del ARNm para ER alfa-A y del ARNm para ER alfa-B, era positiva sin metilación de los respectivos promotores, mientras que la expresión del ARNm para el ER alfa-C era negativa con promotor ER alfa-C metilado. Estos resultados sugieren que la metilación del gen ER parece actuar como supresor de la transcripción.

Respecto de la metilación en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, mostraron que los tres promotores carecían de metilación en todos los tejidos normales. Además, los promotores ER alfa-A y alfa-B no se encontraban metilados en la mayoría de los carcinomas endometriales, pero en la mayoría de los casos (94%) el promotor ER alfa-C sí se encontraba metilado. Sin embargo, dado que no existía información disponible respecto de la expresión de transcritos de ER alfa-A, alfa-B y alfa-C en los casos de carcinoma, no se evaluó la correlación entre el estado de metilación y la expresión. Debe tenerse en cuenta también que las CpGs de los tres promotores por ellos investigados fueron diferentes que las examinadas por nosotros en nuestros estudios.

En general, existe en la actualidad un número limitado de informes respecto de la metilación del gen ER y su expresión en los carcinomas endometriales. Entre estos informes, los sitios CpG examinados, los métodos empleados y los resultados obtenidos son muy diferentes entre sí. El consenso es que: 1) el promotor ER alfa, independientemente de sus sitios CpG, se encuentra a menudo metilado en las líneas celulares de carcinoma endometrial ER alfa-negativas, y viceversa; 2) no se observó metilación en el endometrio normal. Sin embargo, es difícil llegar a una conclusión respecto de la correlación entre la metilación ER alfa y la expresión en los carcinomas endometriales; pese a que nuestros datos mostraron una significativa correlación entre la metilación del gen ER alfa y su inhibición, los resultados provenientes de otros estudios difieren de los de nuestro informe. La razón exacta de la discrepancia es desconocida actualmente, y una posible explicación podría ser la diferencia de enfoques técnicos y sitios CpG examinados.

Resumen

Recientes investigaciones revelaron que el cambio epigenético mediado por la metilación de CpGs se vincula profundamente con el desarrollo embrionario y la carcinogénesis de varios tumores. Además, la disminución de la expresión mediada por la metilación del ER alfa parece estar indicada en las células de carcinoma endometrial y de carcinoma mamario. Sin embargo, parece que existen todavía algunas discrepancias entre los resultados de diferentes estudios. Así, el mejoramiento de las tecnologías podría contribuir a llevar la situación actual hacia una más concreta. Además, los objetivos futuros serán examinar si la metilación de ciertas CpGs críticas podría comportarse como un factor importante en la represión transcripcional del gen ER alfa, y evaluar cuán profundamente podría estar involucrada la densidad de la metilación en la supresión de la transcripción, especialmente en tejidos *in vivo*. Además, pese a que se considera que la metilación de CpGs es generalmente evocada por las metiltransferasas, los mecanismos que explicarían por qué estas enzimas son activadas durante la transformación maligna de las células permanecen aún sin dilucidar. Se necesitan mayores investigaciones para aclarar estas cuestiones.

Tanri Shiozawa

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2004