



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Elyzabeth Avvad Portari

Estudo de polimorfismos nos genes *TP53* e *p21(WAF1)* e do perfil imunohistoquímico das proteínas p53, p21(WAF1), p16(INK4a) e ciclina D1 pela técnica de *Tissue Microarray* (TMA) e sua importância para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais

Rio de Janeiro

2012

Elyzabeth Avvad Portari

Estudo de polimorfismos nos genes *TP53* e *p21(WAF1)* e do perfil imunohistoquímico das proteínas p53, p21(WAF1), p16(INK4a) e ciclina D1 pela técnica de *Tissue Microarray* (TMA) e sua importância para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra Jacyara Maria Brito Macedo

Coorientadora: Prof^a Dra Cíntia Barros Santos Rebouças

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P842 Portari, Elyzabeth Avvad.
Estudo de polimorfismos nos genes *TP53* e *p21(WAF1)* e do perfil imunohistoquímico das proteínas p53, p21(WAF1), p16(INK4a) e ciclina D1 pela técnica de *Tissue Microarray* (TMA) e sua importância para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais/
Elyzabeth Avvad Portari. – 2012.
215 f.

Orientadora: Jacyara Maria Brito Macedo
Coorientadora: Cíntia Barros Santos Rebouças.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Neoplasias do colo do útero. 2. Infecções por papilomavírus. 3. Doenças do vírus do papiloma – Teses. 4. Imunohistoquímica - Teses. I. Macedo, Jacyara Maria Brito. II. Rebouças, Cíntia Barros Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 618.146-006.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Elyzabeth Avvad Portari

Estudo de polimorfismos nos genes *TP53* e *p21(WAF1)* e do perfil imunohistoquímico das proteínas p53, p21(WAF1), p16(INK4a) e ciclina D1 pela técnica de *Tissue Microarray* (TMA) e sua importância para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra Jacyara Maria Brito Macedo

Coorientadora: Prof^a Dra Cíntia Barros Santos Rebouças

Aprovada em 19 de setembro de 2012.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Jacyara Maria Brito Macedo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Fernando Regla Vargas
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof.^a Dra. Maria Helena Faria Ornellas de Souza
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Leonardo Pereira Quintella
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Miguel e Maria, responsáveis pelas minhas conquistas, a quem eu jamais terei como retribuir.

Ao meu melhor amigo e companheiro de vida Pedro, que sempre me incentivou e nunca deixou de estar ao meu lado.

Aos meus queridos filhos Pedro e Rafael, que são a alegria da minha vida.

Aos meus irmãos, Ana Paula e Elias, que apesar de sermos tão diferentes e independentes, somos um trio eterno.

AGRADECIMENTOS

À professora Jacyara Maria Brito Macedo, pela orientação, ensinamentos científicos, exemplo de retidão e dedicação à pesquisa, além do apoio e incentivo que permitiu a realização desse trabalho. Obrigada pela amizade que se solidificou ao longo desta jornada e pela sua presença nos momentos difíceis que vivenciamos juntas.

À professora Cíntia Rebouças, pela confiança, orientação, apoio e atenção constante ao nosso trabalho.

À Professora Nádia Gomes que foi a minha orientadora de mestrado e indiretamente possibilitou que eu realizasse este trabalho.

À Amanda, Sandra, Cris, Leandro, Amanda Lima e Rafael pelos valiosos ensinamentos na bancada, pela amizade, carinho e cumplicidade nos momentos difíceis e também nas conquistas de cada dia durante esta jornada.

Em especial, à Amanda que esteve sempre ao meu lado, observando, me ensinando e ajudando a resolver os problemas técnicos mais difíceis, que permitiu o meu crescimento dentro do mundo da biologia molecular. À Sandra pela realização de parte das análises estatísticas e confecção de esquemas e tabelas, além do enorme carinho e disponibilidade em me ajudar em algumas situações delicadas e ao Leandro, que fez toda a análise do polimorfismo do íntron 3.

A todos da equipe do Laboratório LBQ1 pela ajuda, carinho, apoio e companheirismo.

A Célia Cohen, pela amizade e imensa disponibilidade em realizar as análises estatísticas.

Ao Carlos Roberto Gayer e Fabíola Rodrigues, muito atenciosos e eficientes em ajudar nas análises estatísticas.

Aos meus amigos da Disciplina de Anatomia Patológica da FCM/HUPE/UERJ e do Departamento de Anatomia Patológica do IFF/FIOCRUZ que torceram e me ajudaram esse tempo todo.

Às minhas residentes muito queridas, pela força, carinho e amizade, além da superajuda da Ana Carolina na realização de esquemas e fotos.

À equipe do Serviço de Patologia Cervical do IFF, chefiados pelo Dr Fábio Russomano e a Dra Maria José de Camargo, pelo carinho, ensinamento e facilitação da coleta dos materiais.

À professora Andreia Pires e a sua equipe do laboratório Fonte Medicina Diagnóstica pela realização da técnica de TMA e reações imunohistoquímicas.

Aos meus pais Miguel e Maria, Pedro e Fernanda que sempre me apoiaram, amaram e entenderam as ausências nesse período.

Ao Pedro Eder por ter sido meio mãe e um superpai dos nossos filhos nesse período, além do amor, carinho, imensa compreensão, preocupação e apoio diário ao longo dessa trajetória.

Aos meus filhos Pedro e Rafael que sempre me disseram que eu conseguiria e que bastava escrever uma redação, agradeço a paciência, o carinho, as palavras de conforto e os seus sorrisos.

Aos meus irmãos, Ana Paula, Elias e Fernando, que mesmo estando longe, tenho a certeza de estarmos sempre juntos.

À Nivalda e Dione, por todo o trabalho, carinho e dedicação dispensados a mim e a minha família neste momento em que estive distante dos meus filhos e da minha casa.

A todas as pacientes que se dispuseram a participar deste estudo, meu muito obrigada especial.

Enfim, agradeço a todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Eu caminho vivo no meu sonho estrelado.....

- *Victor Hugo*

RESUMO

PORTARI, Elyzabeth Avvad. *Estudo de polimorfismos nos genes TP53 e p21(WAF1) e do perfil imunohistoquímico das proteínas p53, p21(WAF1), p16(INK4a) e ciclina D1 pela técnica de Tissue Microarray (TMA) e sua importância para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais*. 2012. 215f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O câncer de colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais frequente em mulheres no mundo, e a infecção persistente pelo papilomavirus humano (HPV) oncogênico é condição necessária, mas não suficiente para seu desenvolvimento. As oncoproteínas virais E6 e E7 interferem direta ou indiretamente na ação de várias proteínas celulares. Entretanto, as variantes proteicas, resultantes de polimorfismos genéticos, podem apresentar comportamento distinto mediante a infecção pelo HPV. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis associações entre polimorfismos nos genes *TP53* (*p53* PIN3, *p53* 72C>G) e *p21* (*p21* 31C>A) e o desenvolvimento de neoplasias cervicais, considerando os níveis de expressão das proteínas p53, p21, p16 e ciclina D1, e fatores de risco clássicos para o câncer cervical. Foram selecionadas 466 mulheres residentes no Rio de Janeiro, 281 com diagnóstico histopatológico de neoplasia cervical de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) e câncer (grupo de casos) e 185 sem história atual ou pregressa de alteração citológica do colo uterino (grupo controle). A técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), foi empregada na análise dos polimorfismos *p53* 72C>G e *p21* 31C>A, usando as enzimas de restrição *Bst*UI e *Bsm*al, respectivamente. A avaliação do polimorfismo *p53* PIN3 (duplicação de 16 pb) foi feita por meio da análise eletroforética direta dos produtos de PCR. A expressão das proteínas p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 e a pesquisa de anticorpos anti-HPV 16 e HPV *pool* foram avaliadas por imunohistoquímica (*Tissue Microarray* - TMA) em 196 biópsias do grupo de casos. O grupo controle se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação aos três polimorfismos avaliados. As distribuições genotípicas e alélicas relativas a *p53* PIN3 e *p53* 72C>G nos grupos controles e de casos não apresentaram diferenças significativas, embora o genótipo *p53* 72CC tenha aumentado o risco atribuído ao uso de contraceptivos das pacientes apresentarem lesões mais severas (OR=4,33; IC 95%=1,19-15,83). O genótipo *p21* 31CA(Ser/Arg) conferiu proteção ao desenvolvimento de HSIL ou câncer (OR=0,61, IC 95%=0,39-0,97), e modificou o efeito de fatores de risco associados à severidade das lesões. A interação multiplicativa de alelos mostrou que a combinação *p53* PIN3A1, *p53* 72C(Pro) e *p21* 31C(Ser), representou risco (OR=1,67, IC95%=1,03-2,72) e a combinação *p53* PIN3A1, *p53* 72C(Pro) e *p21* 31A(Arg) conferiu efeito protetor (OR=0,26, IC95%=0,08-0,78) para o desenvolvimento de HSIL e câncer cervical. Observou-se correlação positiva da expressão de p16 e p21 e negativa da ciclina D1 com o grau da lesão. A distribuição epitelial de p16, Ki-67, p21 e p53 se mostrou associada à severidade da lesão. Os polimorfismos analisados não apresentaram associação com a expressão dos biomarcadores ou positividade para HPV. Nossos resultados sugerem a importância do polimorfismo *p21* 31C>A para o desenvolvimento das neoplasias cervicais e ausência de correlação dos polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G com a carcinogênese cervical, embora alguns genótipos tenham se comportado como modificadores de risco. Nossos resultados de TMA corroboram o

potencial de uso de biomarcadores do ciclo celular para diferenciar as lesões precursoras do câncer cervical.

Palavras-chave: Neoplasia cervical. Gene *TP53*. Gene *p21(CDKN1A)*. Polimorfismo *p53* PIN3. Polimorfismo *p53* 72C>G. Polimorfismo *p21* 31C>A. Imunohistoquímica. *p53*, *p21*, *p16^{INK4a}*, ciclina D1 e Ki-67. Infecção por HPV.

ABSTRACT

Cervical cancer is the third most common female cancer worldwide, and persistent infection by the Human Papillomavirus (HPV) is a necessary but not sufficient condition to cause it. The viral oncoproteins E6 and E7 interfere directly or indirectly with the action of various cellular proteins. However, the protein variants, resulting from genetic polymorphisms, may act differently when encountering HPV infection. The aim of this study was to evaluate possible associations between polymorphisms in the *TP53* (*p53* PIN3, *p53* 72C>G) and *p21* (*p21* 31C>A) genes, and the development of cervical neoplasia, considering the expression levels of p53, p21, p16 and cyclin D1 proteins, together with classic risk factors for cervical cancer. A total of 466 women resident in Rio de Janeiro were selected, being 281 with histopathological diagnosis of low (LSIL) or high grade (HSIL) cervical neoplasia or cancer (test group), and 185 with no current or previous history of alteration of cervical cytology (control group). The PCR-RFLP technique (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) was used to analyze the *p53* 72C>G and *p21* 31C>A polymorphisms, using *Bst*UI and *Bsm*al restriction enzymes, respectively. Genotyping of the *p53* PIN3 (duplication of 16 pb) polymorphism was performed by direct electrophoretic analysis of the PCR products. The expression of p53, p21, p16, cyclin D1 and Ki-67 proteins and the study of anti-HPV 16 and anti-HPV pool positivities were evaluated by immunohistochemistry (Tissue Microarray - TMA) in 196 biopsies of cases. The control group obeyed the Hardy-Weinberg principle in relation to the three polymorphisms analysed. The genotypic and allelic frequencies regarding *p53* PIN3 and *p53* 72C>G in the control and test groups were not significantly different, although the *p53* 72CC genotype has increased the risk of more severe lesions attributed to the use of contraceptives (OR=4.33; IC 95%=1.19-15.83). The *p21* 31CA(Ser/Arg) genotype showed to protect against the development of HSIL or cancer (OR=0,61, IC 95%=0,39-0,97), and modified the effect of risk factors associated to the lesion severity. The multiplicative interaction of alleles showed that the combination *p53* PIN3A1, *p53* 72C(Pro) and *p21* 31C(Ser) represented risk (OR=1,67, IC95%=1,03-2,72) and the combination *p53* PIN3A1, *p53* 72C(Pro) and *p21* 31A(Arg) conferred protection (OR=0,26, IC95%=0,08-0,78) against the development of HSIL and cervical cancer. It was observed positive and negative correlations of, respectively, p16 and p21, and cyclin D1 expression with the cervical lesion grade. The epithelial distribution of p16, Ki-67, p21 and p53 was associated with the lesion severity. The polymorphisms analyzed showed neither association with the expression of the biomarkers nor positivity for HPV. Our results suggest the importance of polymorphism *p21* 31C>A in the development of cervical neoplasia and the lack of correlation between the polymorphisms *p53* PIN3 and *p53* 72C>G with cervical carcinogenesis, although some genotypes acted as risk modifiers. Our TMA results corroborated the potential use of cell cycle biomarkers as an adjunctive tool to differentiate cervical precursor lesions.

Keywords: Cervical neoplasia. *TP53* gene. *p21*(*CDKN1A*) gene. *p53* PIN3 polymorphism. *p53* 72C>G polymorphism. *p21* 31C>A polymorphism. Immunohistochemical expression of p53, p21, p16^{INK4a}, cyclin D1, and Ki-67. HPV infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo de útero, por 100.000 mulheres, estimadas para 2012 / 2013, segundo a Unidade da Federação	27
Figura 2	Taxas de mortalidade, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 mulheres, entre 1979 e 2009.....	28
Figura 3	Carcinogênese cervical.....	30
Figura 4	Controle do ciclo celular.....	35
Figura 5	Genoma do HPV 16.....	37
Figura 6	A fosfoproteína p53.....	43
Figura 7	Cromossomo 17 e o gene <i>TP53</i>	49
Figura 8	Cromossomo 6 e o gene <i>p21</i>	55
Quadro 1	Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação das regiões genômicas de interesse. Suas sequências, genes alvos e tamanhos dos amplicons resultantes.....	68
Quadro 2	Condições de ciclagem das três reações de amplificação: p5334-PCR e p2131-PCR.....	69
Figura 9	Esquema representativo da análise molecular do polimorfismo do íntron 3 do gene <i>TP53</i>	71
Figura 10	Esquema representativo da análise do polimorfismo do códon 72 do éxon 4 do gene <i>TP53</i>	73
Figura 11	Esquema representativo da análise do polimorfismo do códon 31 do gene <i>p21</i>	75
Figura 12	Análise molecular do polimorfismo <i>p53</i> PIN3.....	85

Figura 13	Análise molecular do polimorfismo <i>p53 72C>G</i>	86
Figura 14	Análise molecular do polimorfismo <i>p21 31C>A</i>	87
Figura 15	Imagem de resultados de sequenciamento da região contendo o polimorfismo <i>p53 PIN3</i>	88
Figura 16	Imagem de resultados de sequenciamento da região contendo o polimorfismo <i>p53 72C>G</i>	89
Figura 17	Imagem de resultados de sequenciamento da região contendo o polimorfismo <i>p21 31C>A</i>	90
Figura 18	Análise imunohistoquímica para p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 em mucosa cervical com LSIL, HSIL e carcinoma escamoso.....	105
Figura 19	Microfotografia de mucosa do colo uterino, coloração imunohistoquímica para pesquisa de anticorpos anti-HPV16 com forte positividade nuclear evidente no terço superior do epitélio escamoso.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características sociodemográficas das integrantes dos grupos de casos e controles.....	83
Tabela 2	Teste de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg nos grupos e subgrupos de estudo.....	91
Tabela 3	Análise comparativa das frequências genótípicas e alélicas correspondentes ao polimorfismo <i>p53</i> PIN3 entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	93
Tabela 4	Análise comparativa das frequências genótípicas e alélicas correspondentes ao polimorfismo <i>p53</i> 72C>G entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	94
Tabela 5	Análise comparativa das frequências genótípicas e alélicas correspondentes ao polimorfismo <i>p21</i> 31C>A entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	96
Tabela 6	Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3 e <i>p53</i> 72C>G entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	99
Tabela 7	Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3 e <i>p21</i> 31C>A entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	99
Tabela 8	Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	100
Tabela 9	Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A (n=459) entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	101
Tabela 10	Análise multiplicativa de alelos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A entre o grupo controle e o subgrupo LSIL.....	102
Tabela 11	Análise multiplicativa de alelos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A entre os subgrupos de casos LSIL e HSIL+câncer.....	103

Tabela 12	Análise multiplicativa de alelos referentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A entre o grupo controle e o subgrupo HSIL+câncer.....	103
Tabela 13	Análise da positividade imunohistoquímica para <i>p53</i> , <i>p21</i> , <i>p16</i> , ciclina D1 e Ki-67 nas lesões cervicais.....	106
Tabela 14	Análise da positividade imunohistoquímica para <i>p53</i> , <i>p21</i> , <i>p16</i> , ciclina D1 e Ki-67 nas lesões cervicais, em relação à distribuição epitelial.....	107
Tabela 15	Análise da positividade imunohistoquímica para <i>p53</i> , <i>p21</i> , <i>p16</i> , ciclina D1 e Ki-67 nas lesões cervicais, em relação à intensidade da marcação.....	108
Tabela 16	Relação entre a positividade de expressão imunohistoquímica de <i>p53</i> , <i>p21</i> , ciclina D1, <i>p16</i> , Ki-67, HPV pool e HPV-16 nas neoplasias cervicais.....	112
Tabela 17	Coeficiente de correlação de Pearson entre o laudo histopatológico das neoplasias cervicais (LSIL, HSIL e câncer) e as distribuições epiteliais da expressão imunohistoquímica de <i>p53</i> , <i>p21</i> , <i>p16</i> , ciclina D1, Ki-67 e HPV 16.....	112
Tabela 18	Correlação entre as frequências genótípicas e alélicas correspondentes aos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A e a expressão imunohistoquímica de <i>p53</i> , <i>p21</i> , <i>p16</i> , ciclina D1, Ki-67, HPV pool e HPV 16 no grupo e subgrupos de casos.....	114
Tabela 19	Dados de diferentes publicações referentes a estudo de associação entre o polimorfismo <i>p53</i> 72C>G e neoplasias cervicais. Informações sobre país e etnia, material usado para genotipagem, tamanho amostral, e se grupo controle se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A:	Adenina
C:	Citocina
CCE:	Carcinoma de células escamosas
CDK:	Quinase dependente de ciclina
CDKI:	Inibidor de quinase dependente de ciclina
CTD:	Domínio carboxi-terminal
CYP:	Citocromo P-450
4D:	Domínio de tetramerização
DAB:	Diaminobenzidina
dATP:	2'desoxiadenosina 5' trifosfato
DBD:	Domínio de ligação de DNA
dCTP:	2'desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP:	2'desoxiguanosina 5' trifosfato
dTTP:	2'desoxitimidina 5' trifosfato
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs:	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dp:	Desvio padrão
DST:	Doença sexualmente transmissível
E2F:	Fator de transcrição E2F
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetracético
FIGO:	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FIOCRUZ:	Fundação Oswaldo Cruz
G:	Guanina
GADD45:	<i>Grow arrest and DNA-damage inducible</i>

GST:	Glutathione S-transferase
HE:	Hematoxilina e eosina
HIV:	Vírus da imunodeficiência humana
HLA:	Antígeno leucocitário humano
HPV:	Papilomavírus humano
HR-HPV:	HPV de alto risco oncogênico
HSIL:	Lesão escamosa intraepitelial cervical de alto grau
hTERT:	Human telomerase reverse transcriptase
HUPE:	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IARC:	Agência Internacional de Pesquisa de Câncer
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC:	Intervalo de confiança
IFF:	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
kb:	Kilobase
kDa:	Kilodalton
LCR:	Região longa de controle
LSIL:	Lesão escamosa intraepitelial cervical de baixo grau
LR-HPV:	HPV de baixo risco oncogênico
MDM2:	<i>Murine Double-minute 2</i>
mRNA:	RNA mensageiro
MS:	Ministério da Saúde
MYOD1:	Myoblast determination protein 1
NCBI:	National Center of Biotechnology Information
NIC:	Neoplasia intraepitelial cervical

NIC 1:	Neoplasia intraepitelial cervical grau 1
NIC 2:	Neoplasia intraepitelial cervical grau 2
NIC 3:	Neoplasia intraepitelial cervical grau 3
NFY:	Fator de transcrição nuclear Y
OMIN:	Online Mendelian Inheritance in Man
OR:	Razão de chance
pb:	pares de base
PBS:	Phosphate buffered saline
PCNA:	Proliferating cell nuclear antigen
PCR:	Reação em cadeia da polymerase
PE:	Promotor dos genes de expressão precoce
PL:	Promotor dos genes de expressão tardia
pRb:	Proteína retinoblastoma
PRD:	Domínio rico em prolina
RFLP:	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RNA:	Ácido ribonucleico
rs:	Reference Sequence
SIM:	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SNP:	Polimorfismo de base única
T:	Timina
TAD:	Domínio de transativação N-terminal
TAE:	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE:	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE:	Tampão Tris-EDTA
TEMED:	N'N'N'N'tetrametiletilenodiamina
TGF-β:	Fator de crescimento transformante β

TKM: Tampão Tris-KCl- MgCl₂
TMA: Tissue micro-array
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UTR: Região não traduzida
WHO: Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	24
1	REVISÃO DA LITERATURA	26
1.1	Câncer de colo do útero	26
1.2	O papilomavirus humano (HPV) e as neoplasias cervicais	30
1.3	Carcinogênese cervical	33
1.3.1	<u>Controle do ciclo celular</u>	33
1.3.2	<u>HPV e carcinogênese cervical</u>	36
1.4	Biomarcadores das lesões neoplásicas do colo uterino	40
1.5	As proteínas p53 e p21 como biomarcadores das neoplasias cervicais	43
1.5.1	<u>A proteína p53</u>	43
1.5.2	<u>A proteína p21</u>	44
1.5.3	<u>Expressão das proteínas p53 e p21 nas neoplasias cervicais</u>	45
1.6	Polimorfismos no gene <i>TP53</i> e as neoplasias cervicais	49
1.7	Polimorfismos no gene <i>p21(WAF1)</i> e as neoplasias cervicais	54
2	OBJETIVOS	58
2.1	Objetivo geral	58
2.2	Objetivos específicos	58
3	MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1	Casuística	60
3.2	Considerações éticas	61
3.3	Coleta de material biológico – grupo de casos	62
3.3.1	<u>Sangue periférico</u>	62
3.3.2	<u>Material para estudo histopatológico</u>	62
3.4	Estudo histopatológico	63
3.5	Análise imunohistoquímica	63
3.5.1	<u>Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA) alternativo</u>	63
3.5.2	<u>Técnica de imunohistoquímica</u>	64
3.6	Construção do banco de DNA genômico – grupo de casos	66
3.6.1	<u>Extração de DNA a partir de amostras de sangue periférico</u>	67

3.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR – <i>polymerase chain reaction</i>)	68
3.8	Análise dos polimorfismos do íntron 3 e do códon 72 do gene <i>TP53</i>	69
3.8.1	<u>Amplificação da região que engloba os polimorfismos do íntron 3 (11259 11274del16) e do éxon 4 (11446C>G) do gene <i>TP53</i> - p5334-PCR</u>	69
3.8.2	<u>Análise do polimorfismo do íntron 3 (g.11259 11274del16) do gene <i>TP53</i></u>	70
3.8.3	<u>Análise do polimorfismo do códon 72 (11446C>G) do gene <i>TP53</i></u>	71
3.9	Análise do polimorfismos do códon 31 (10513C>A) do gene <i>p21(WAF1)</i> – p2131-PCR	73
3.9.1	<u>Amplificação da região que engloba o polimorfismo do códon 31 (10513C>A) do gene <i>p21^{WAF1}</i> – p2131-PCR</u>	73
3.9.2	<u>Análise do polimorfismo do códon 31 (10513C>A) do gene <i>p21^{WAF1}</i></u>	74
3.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida	76
3.11	Eletroforese em gel de agarose	77
3.12	Sequenciamento de DNA	77
3.12.1	<u>Purificação do produto de PCR</u>	78
3.12.2	<u>Reação de sequenciamento</u>	78
3.12.3	<u>Precipitação dos produtos da reação</u>	79
3.12.4	<u>Desnaturação e sequenciamento</u>	79
3.13	Análise estatística	79
4	RESULTADOS	82
4.1	População de estudo	82
4.1.1	<u>Características sociodemográficas da população de estudo</u>	82
4.2	Análise dos polimorfismos <i>p53</i> PIN3 e <i>p53</i> 72C>G	84
4.3	Análise do polimorfismo <i>p21</i> 31C>A	86
4.4	Confirmação dos genótipos correspondentes aos polimorfismos estudados por sequenciamento de DNA	87
4.5	Avaliação do equilíbrio genético de Hardy-Weinberg nos grupos de estudo com relação aos polimorfismos dos genes <i>TP53</i> e <i>p21</i>	90

4.6	Distribuições genótípicas e alélicas do polimorfismo <i>p53</i> PIN 3 nos grupos controle e de casos e nos subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	91
4.7	Distribuições genótípicas e alélicas do polimorfismo <i>p53</i> 72C>G nos grupos controle e de casos e nos subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	92
4.8	Distribuições genótípicas e alélicas do polimorfismo <i>p21</i> 31C>A nos grupos controle, de casos e os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	95
4.9	Análise de interação dos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A com os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de neoplasias cervicais.....	97
4.10	Análise de combinação de genótipos.....	98
4.11	Análise multiplicativa de alelos dos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A nos grupos controle e subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.....	102
4.12	Análise imunohistoquímica de <i>p53</i>, <i>p21</i>, <i>p16</i>, ciclina D1, Ki-67, HPV-16 e HPV <i>pool</i> nas lesões cervicais.....	104
4.12.1	<u>Análise imunohistoquímica da expressão de <i>p53</i> nas lesões cervicais</u>	108
4.12.2	<u>Análise imunohistoquímica da expressão de <i>p21</i> nas lesões cervicais</u>	109
4.12.3	<u>Análise imunohistoquímica da expressão de <i>p16</i> nas lesões cervicais</u>	109
4.12.4	<u>Análise imunohistoquímica da expressão de ciclina D1 nas lesões cervicais.....</u>	109
4.12.5	<u>Análise imunohistoquímica da expressão de Ki-67 nas lesões cervicais.....</u>	110
4.12.6	<u>Análise imunohistoquímica para HPV-16 e HPV <i>pool</i>.....</u>	110
4.13	Comparação entre as expressões de <i>p53</i>, <i>p21</i>, <i>p16</i>, ciclina D1, Ki-67, HPV <i>pool</i> e HPV 16 nas lesões cervicais.....	111
4.14	Correlação entre as expressões de <i>p53</i>, <i>p21</i>, <i>p16</i>, ciclina D1, Ki-67, HPV <i>pool</i> e HPV 16 nos subgrupos LSIL e HSIL+câncer e os polimorfismos nos genes <i>TP53</i> e <i>p21</i>.....	113
5	DISCUSSÃO.....	115

5.1	Fatores de risco clássicos para neoplasias cervicais.....	116
5.2	Importância de polimorfismos nos genes <i>TP53</i> e <i>p21</i> para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais.....	118
5.2.1	<u>Estudo de associação entre o polimorfismo <i>p53</i> 72C>G e as neoplasias cervicais.....</u>	120
5.2.2	<u>Estudo de associação entre o polimorfismo <i>p53</i> 72PIN3 e as neoplasias cervicais.....</u>	129
5.2.3	<u>Estudo de associação entre o polimorfismo <i>p21</i> 31C>A e as neoplasias cervicais.....</u>	131
5.2.4	<u>Estudo de associação entre combinações genótípicas e alélicas dos polimorfismos <i>p53</i> PIN3, <i>p53</i> 72C>G e <i>p21</i> 31C>A e as neoplasias cervicais.....</u>	133
5.3	Avaliação imunohistoquímica da expressão de <i>p53</i>, <i>p21</i>, <i>p16</i>, ciclina D1 e Ki-67 nas neoplasias cervicais.....	135
6	CONCLUSÕES.....	144
	REFERÊNCIAS.....	146
	APÊNDICE A - Questionário aplicado a todas as participantes deste estudo.....	170
	ANEXO A - Avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IFF/FIOCRUZ.....	178
	ANEXO B - Avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE/UERJ.....	179
	APÊNDICE B - TCLE aplicado para as integrantes do grupo de casos.....	180
	APÊNDICE C - TCLE aplicado para as integrantes do grupo controle.....	181
	APÊNDICE D - Análise de interação dos fatores de risco com os genótipos dos SNP estudados comparando os subgrupos LSIL vs HSIL+câncer.....	182
	APÊNDICE E - Análise de interação dos fatores de risco com os genótipos dos SNP estudados comparando o grupo controle vs subgrupo LSIL.....	186

APÊNDICE F - Análise de interação dos fatores de risco com os genótipos dos SNP comparando o grupo controle vs subgrupo HSIL+câncer.....	190
ANEXO C - Carta de aceite do artigo intitulado “Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16(Ink4a), p21(WAF1) and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia” para publicação na revista <i>International Journal of Gynecological Pathology</i>	194
APÊNDICE G - Resultados detalhados dos SNPs para o grupo de casos.....	195
APÊNDICE H - Resultados detalhados dos SNPs para o grupo controle.....	202
APÊNDICE I - Resultados detalhados da análise imunohistoquímica do grupo de casos.....	207

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde - WHO (2010), o câncer de colo uterino é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Cerca de metade dos casos evoluem para óbito, embora existam diferenças marcantes nas taxas de incidência e mortalidade entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento ou subdesenvolvidos.

A partir de 1950 e 1960, com a implementação de programas efetivos de rastreio, que incluem citologia cervical e colposcopia, os países desenvolvidos apresentaram importante redução das taxas de incidência e mortalidade de câncer cervical (WHO – Globocan, 2008). No entanto, as estimativas indicam que mais de um milhão de mulheres em todo o mundo sejam portadoras dessa neoplasia, uma vez que grande parte das pacientes não tem acesso aos programas de rastreio e tratamento, permanecendo ainda sem diagnóstico.

O principal fator de risco para o câncer cervical é a infecção persistente por papilomavirus humano (HPV) de alto risco oncogênico. Estima-se que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas irão adquirir essa infecção ao longo de suas vidas, particularmente no início da vida sexual. Entretanto, a maioria das infecções por HPV na mucosa cervical são transitórias e autolimitadas, regredindo espontaneamente entre seis meses a dois anos após a exposição (IARC, 2007). Somente em um pequeno número de casos, nos quais a infecção, especialmente por HPV de alto risco oncogênico, persiste, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras, que quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente podem evoluir para o câncer invasor (WHO, 2010). Esses dados indicam que apesar de a infecção pelo HPV se mostrar necessária não é suficiente para a carcinogênese cervical, e que fatores genéticos, imunológicos e comportamentais possam influenciar a persistência da infecção e/ou mediar a progressão das lesões pré-malignas para o câncer cervical.

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de avaliar a importância dos fatores genéticos para o desenvolvimento das neoplasias cervicais, entretanto, os resultados são conflitantes e o seu potencial de uso ainda não foi estabelecido. Além disso, poucos são os trabalhos desenvolvidos na população brasileira, que apresenta grande heterogeneidade étnica. Dessa forma, os objetivos deste trabalho

incluíram a avaliação da importância de polimorfismos nos genes *TP53* e *p21^{WAF1}* como fatores de risco ou modificadores de risco de desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais, e dos padrões de expressão das proteínas p53, p21, p16 e ciclina D1 e o *status* em relação à infecção por HPV nos diferentes tipos de lesão cervical. Buscamos, assim, não apenas ampliar o conhecimento dos aspectos genéticos que poderiam contribuir na progressão da doença, como também estabelecer possíveis correlações entre os polimorfismos estudados e os níveis de expressão das diferentes proteínas no tecido com lesão, o que pode ter valor diagnóstico e/ou prognóstico e até mesmo determinar condutas clínicas mais individualizadas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de colo do útero

O câncer de colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais frequente, em termos de taxa bruta, entre as mulheres em todo o mundo, representando 13% das neoplasias malignas no sexo feminino (WHO, 2010). As estimativas anuais são de aproximadamente 500 mil casos novos e cerca de 275 mil óbitos por ano, e sua frequência é maior nos países em desenvolvimento quando comparada aos países desenvolvidos (WHO, 2010). Esse tipo de câncer é consideravelmente mais frequente em mulheres jovens, com idade entre 15 e 44 anos, observando-se um rápido aumento das taxas de incidência até atingir um valor máximo, geralmente na faixa etária de 45 a 54 anos (Castellsagué *et al.*, 2007). A estimativa global de incidência para 2025, tendo como base os valores de 2008, é de um aumento de 30% dos casos de câncer cervical em mulheres com até 64 anos (WHO, 2010).

No Brasil, o número de casos novos de câncer de colo uterino esperado para os anos de 2012/2013 é de 17.540, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011). Excluindo as neoplasias cutâneas malignas não melanoma, estima-se que o câncer do colo do útero será o mais incidente na região Norte (24/100.000), ocupando a segunda posição nas regiões Centro-Oeste (28/100.000) e Nordeste (18/100.000), a terceira posição na região Sudeste (15/100.000) e a quarta posição na região Sul (14/100.000). Há grande variação entre os valores das taxas brutas de incidência desse tipo de neoplasia entre as diferentes regiões do país (Figura 1), observando-se inclusive diferenças importantes entre os estados de uma mesma região, sendo que o Rio de Janeiro (23,71/100.000 mulheres) integra o grupo de estados de maior incidência.

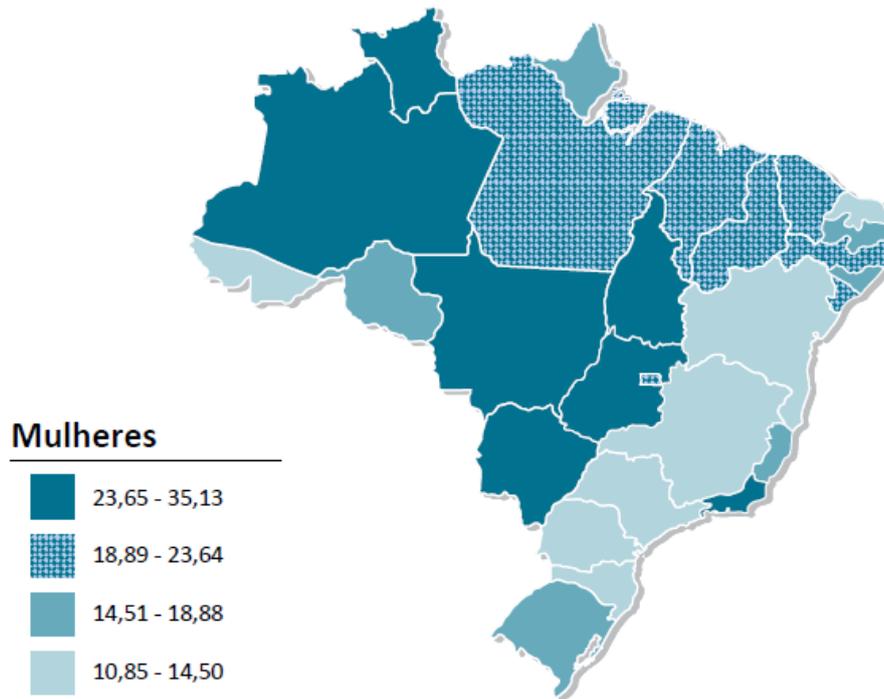


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo de útero, por 100.000 mulheres, estimadas para 2012 / 2013, segundo a Unidade da Federação. Fonte: INCA/MS (2011).

A sobrevida da paciente depende do estágio do tumor cervical no momento do diagnóstico, o que varia de acordo com o grau de desenvolvimento das diferentes regiões geográficas. Em países desenvolvidos, onde cerca de 60% dos casos são diagnosticados no estágio inicial da doença, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 51 a 66%. Já nos países em desenvolvimento a maioria dos casos é diagnosticada em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é menor, sendo aproximadamente 41% após cinco anos (Waggoner, 2003).

No Brasil, cerca de metade das pacientes com câncer de colo do útero ainda é diagnosticada nos estágios mais avançados da doença. Isto contribuiu, em parte, para que os valores das taxas de mortalidade permanecessem estáveis entre 1979 e 2009 (Figura 2) (INCA, 2011).

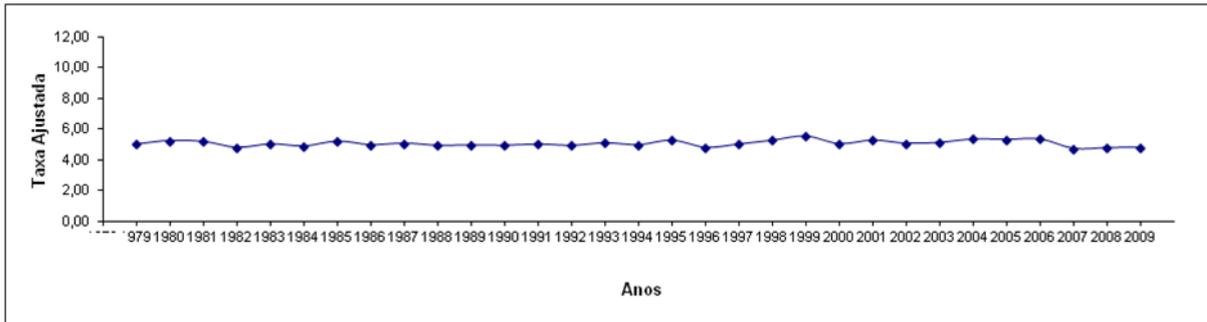


Figura 2: Taxas de mortalidade no Brasil, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 mulheres, entre 1979 e 2009. (Fonte: MS/SIM/IBGE/INCA, 2011).

Sabe-se que a infecção persistente do colo uterino pelo papilomavírus humano (HPV- *Human PapillomaVirus*), especialmente os de alto risco oncogênico, é necessária, embora não seja suficiente para o desenvolvimento de neoplasias cervicais, o que indica a existência de fatores de risco secundários para a carcinogênese cervical. Dentre estes, destacam-se a sexarca precoce, multiplicidade de parceiros sexuais, tabagismo, histórico pessoal de doenças sexualmente transmissíveis (DST), multiparidade, uso de anticoncepcionais orais, baixa condição sócio-econômica e coinfeção por agentes infecciosos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV – *Human Immunodeficiency Virus*) e *Chlamydia trachomatis* (Kjellberg *et al.*, 2000; Bayo *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2006). Cabe salientar, no entanto, que muitos dos fatores mencionados estão associados ao risco de infecção pelo HPV.

A contaminação, infecção e persistência do HPV na mucosa cervical dependem de fatores relacionados não só à virulência desse agente, mas também à capacidade do hospedeiro de organizar uma resposta imune adequada. Admite-se que cerca de 80% de todas as mulheres até a idade de 50 anos terão sido infectadas pelo HPV ao longo da vida (Steben & Duarte-Franco, 2007). Apesar do risco potencial de desenvolvimento de câncer associado a esta infecção, estudos longitudinais evidenciaram que de 80 a 90% dos indivíduos são capazes de promover uma resposta imune eficaz e eliminar adequadamente o vírus, incluindo os de alto risco, em um período de 18 a 24 meses (Stanley *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2008).

O tipo histológico de câncer cervical mais comum, com frequência variando entre 75 a 90% dos casos, corresponde ao carcinoma de células escamosas (CCE), que se origina no epitélio escamoso, seguido pelo adenocarcinoma e pelo carcinoma

adenocarcinoma, os quais provavelmente têm origem no epitélio colunar endocervical. Existem tipos histológicos mais raros, como o carcinoma adenocístico, o carcinoma de células pequenas, o carcinoma neuroendócrino e o carcinoma indiferenciado (IARC, 2004).

Uma característica importante do câncer cervical é seu alto potencial de prevenção e cura, desde que diagnosticado precocemente (Parkin *et al.*, 2001).

O diagnóstico precoce é possível devido à história natural da doença que mostra forte associação entre a infecção persistente da cérvix uterina pelo HPV e o desenvolvimento de lesões pré-malignas de baixo e alto grau. O exame citológico de rotina (Teste de Papanicolaou) possibilita a detecção das lesões pré-malignas do colo uterino, estágios em que os tratamentos comumente empregados se mostram mais eficazes. Dessa forma, é possível prevenir o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais de alto grau, ou mesmo o câncer em seus estágios iniciais assintomáticos, viabilizando, assim, o uso de conduta terapêutica mais apropriada, o que contribui para um melhor prognóstico (Zapka *et al.*, 2003).

A classificação atualmente utilizada das lesões pré-malignas do colo uterino é a baseada no Sistema de Bethesda (2001) (Solomon *et al.*, 2002). Nessa classificação, as lesões são subdivididas em dois grupos, as chamadas lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau - LSIL (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) e as lesões intraepiteliais cervicais de alto grau - HSIL (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*). O grupo LSIL inclui os casos de infecções virais produtivas, causadas por HPV de baixo risco oncogênico e representadas morfológicamente por coilocitose e/ou binucleação, e as displasias leves ou neoplasias intraepiteliais cervicais grau I (NIC I), com ou sem alterações coilocitóticas. Já o grupo HSIL engloba lesões de conotação neoplásica, representadas pelas displasias moderadas ou neoplasias intraepiteliais cervicais grau II (NIC II) e pelas displasias acentuadas/carcinoma *in situ* ou neoplasias intraepiteliais cervicais grau III (NIC III), causadas por HPV de alto risco oncogênico e com grande chance de progressão para carcinoma invasor caso não sejam tratadas (Figura 3).

No Brasil, assim como na maioria dos países em desenvolvimento, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente para mulheres de 25 a 59 anos e, se bem empregada, estima-se redução de cerca de 80% da mortalidade por esse tipo de câncer. Para tanto, é

necessário garantir a organização, a integralidade e a qualidade do programa de rastreamento, bem como o seguimento apropriado das pacientes (INCA, 2011).

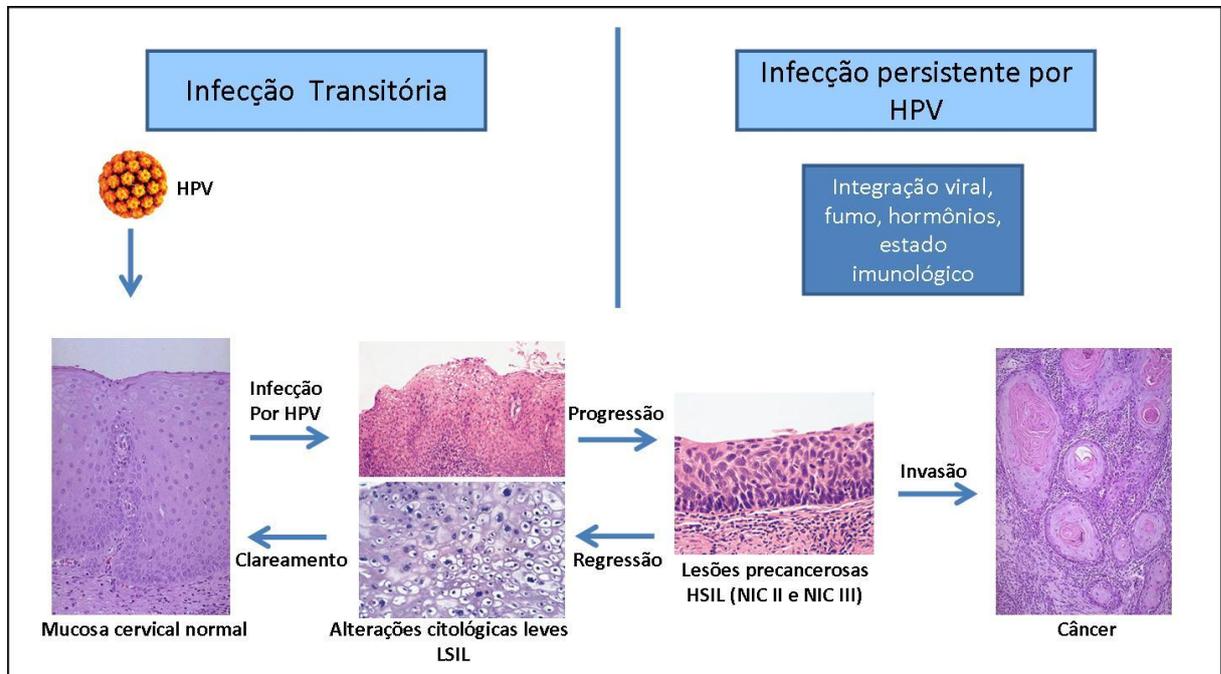


Figura 3: Carcinogênese cervical. Etapas, fatores de risco e os aspectos morfológicos observados na mucosa escamosa normal, nos casos de LSIL, HSIL e carcinoma escamoso (Modificado de Wright & Schiffman, 2003; Fotomicrografias 1 e 4: WebPath®; 2: Photo Researches, Sciencesource Naturesource; 3: Uazwebpath).

1.2 O papilomavírus humano (HPV) e as neoplasias cervicais

A infecção pelo HPV é condição necessária para o desenvolvimento da lesão intraepitelial de alto grau e do câncer invasivo do colo uterino. Porém, por si só, não é uma causa suficiente, uma vez que, além da persistência da infecção, do tipo do HPV e da carga viral, sua associação com outros fatores de risco também se mostra importante para o desenvolvimento, a manutenção e a progressão das lesões neoplásicas (Kim & Zhao, 2005; Doorbar, 2006).

Os papilomavírus são vírus icosaédricos, pequenos, não envelopados e com diâmetro variando entre 52 e 55 nm (IARC, 2007), podendo ser encontrados na pele e na mucosa de vários animais. Até o momento, cerca de 200 tipos diferentes foram identificados por sequenciamento de DNA. Desse total, mais de 80 tipos foram caracterizados e cerca de 40 podem infectar a região anogenital (Münger *et al.*, 2004; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009). Os papilomavírus genitais são

classificados como sendo de alto risco oncogênico (HR-HPV, do inglês *high-risk* HPV) ou de baixo risco oncogênico (LR-HPV, do inglês *low-risk* HPV), de acordo com, respectivamente, sua presença ou não em lesões malignas (Lowy *et al.*, 1994; Muñoz, 2000; zur Hausen, 2002; Münger *et al.*, 2004). Em 2002, zur Hausen listou 41 tipos de papilomavírus detectados em lesões genitais, que incluem as verrugas (“*condyloma acuminata*”), as lesões intraepiteliais e os cânceres cervicais e anogenitais.

Na classificação proposta por IARC (*International Agency for Research on Cancer*), são considerados HPV de alto risco oncogênico para a região anogenital os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66, enquanto os tipos 6 e 11 são considerados de baixo risco (IARC, 2007). Já na classificação epidemiológica proposta por Muñoz os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, 68, 73 e 82 integram o grupo de alto risco; no grupo de provável alto risco encontram-se os tipos 26, 53 e 66 e o grupo de baixo risco inclui os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89 (CP6108) (Muñoz *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2006).

Os resultados de um estudo de meta-análise para estimar a prevalência de infecção por HPV em mulheres com citologia normal na população mundial indicam variação entre 8,0% (Ásia) e 22,1% (África), com média de 10,4% (De Sanjosé *et al.*, 2007). Em todas as regiões analisadas, os maiores valores de prevalência foram evidenciados em mulheres com menos de 35 anos. Nas Américas do Sul, Central e do Norte, na Europa e na África, um segundo pico de incidência foi observado em mulheres com mais de 45 anos. Com base nesses dados, estima-se que aproximadamente 291 milhões de mulheres em todo o mundo são portadoras de DNA de HPV, das quais 32% estão infectadas pelos HPV 16 e/ou 18 (De Sanjosé *et al.*, 2007). Estudo com base populacional realizado pelo nosso grupo de pesquisa em mulheres residentes na cidade do Rio de Janeiro revelou uma prevalência de infecção por HPV de 10,4% (dados não publicados).

Grupos de indivíduos que apresentam algum grau de imunossupressão, como pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Grinsztejn *et al.*, 2009) ou mulheres transplantadas renais (Veroux *et al.*, 2009) apresentam maior prevalência de infecção por HPV em comparação à população geral. Nosso grupo de pesquisa constatou uma maior prevalência de infecção por HPV em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico (LES) quando comparadas com mulheres não portadoras de LES (20,2% vs 7,3%) (Klumb *et al.*, 2010). As pacientes com quadro

de imunossupressão severa, promovido pelo uso de agentes citostáticos por um período mínimo de um ano, apresentaram valores ainda maiores em comparação com o subgrupo de pacientes com imunossupressão leve (28,3% vs 12,5%) (Klumb *et al.*, 2010).

Aproximadamente todos os casos de câncer do colo do útero são causados por um ou mais tipos de HPV atualmente reconhecidos como de alto risco oncogênico. Inúmeros estudos epidemiológicos sobre a prevalência de tipos de HPV em tumores cervicais em vários países mostram que aproximadamente 70% dos casos estão associados aos tipos 16 e 18 e que cerca de 18% estão relacionados a HPV dos tipos 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, havendo variação da prevalência destes subtipos menos frequentes entre os diferentes países (Clifford *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2004; Sowjanya *et al.*, 2005; Castellsagué *et al.*, 2007; Tornesello *et al.*, 2008; Wheeler *et al.*, 2009).

O tipo de HPV que predomina nos CCE é diferente do tipo viral mais comumente associado a outros tipos histológicos de câncer cervical. No estudo de Muñoz e colaboradores (2004), que incluiu amostras de hospitais de 25 países, o HPV 16 foi o tipo predominante em carcinomas de células escamosas (57,4%), e o HPV 18 foi observado com maior frequência em adenocarcinomas e tumores adenoescamosos (37,3%). Tem sido observada ainda variação geográfica do tipo mais prevalente de HPV, assim como dos tipos menos comuns, tais como HPV 45, com maior prevalência no oeste da África e Américas Central e do Sul, HPV 39 e HPV 59, encontrados quase que exclusivamente nas Américas Central e do Sul, e HPV 58 com elevada prevalência na Ásia e África sub-Saara (Muñoz *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2004; Smith JS *et al.*, 2007).

Assim como demonstrado em diferentes países, estudos realizados no Brasil indicaram que o HPV 16 é o tipo predominante em lesões escamosas de alto grau e câncer do colo uterino nas cinco regiões do país (Rabelo-Santos *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2009; Ayres & Silva, 2010) com valores variando entre 43,5%, na região norte (Noronha *et al.*, 1999), 58,2%, na região nordeste (Lima Júnior *et al.*, 2011) e 67% na região sul (Krambeck *et al.*, 2008). Em relação aos outros tipos de HPV, foram observadas variações regionais, sendo que na maioria das regiões o segundo tipo mais prevalente é o HPV 18, com exceção da região centro-oeste, onde predomina o HPV 33, e na região nordeste, onde o HPV 31 é o segundo em prevalência (Cavalcanti *et al.*, 2000;; Rabelo-Santos *et al.*, 2003). Estudos realizados nas regiões

sul (Paesi *et al.*, 2009) e nordeste (Fernandes *et al.*, 2010) mostraram elevada prevalência do HPV 58, que ocupa a segunda posição em pacientes com lesões malignas e pré-malignas do colo uterino. Em outros estudos realizados com amostras brasileiras, confirmou-se a predominância do tipo HPV 16 em pacientes com citologia normal, lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina (Freitas *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Baldez da Silva *et al.*, 2012). Como observado em outros trabalhos brasileiros, um estudo realizado em pacientes atendidas no Ambulatório de Colposcopia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) revelou baixa frequência de HR-HPV nas pacientes com citologia normal (7,7%) e valores crescentes em pacientes com LSIL (33,3%) e HSIL/câncer (71,4%), com predominância do HPV 16 (dados não publicados).

Com base nas evidências de que a infecção persistente por HR-HPV está associada ao desenvolvimento de neoplasias cervicais, e de que os tipos 16 e 18 são os mais prevalentes nas pacientes com câncer cervical em todo o mundo, foram desenvolvidas vacinas profiláticas bivalente contra os tipos 16 e 18 (Cervarix, GlaxoSmithKline), e tetravalente contra os tipos 6, 11, 16 e 18 (Gardasil, Merck). Estas já fazem parte, nos países desenvolvidos, da estratégia para o controle do câncer de colo uterino, garantindo de modo seguro e eficaz a disponibilização da vacina prioritariamente para as mulheres jovens, na fase da adolescência, além das medidas educacionais, exames citológicos e identificação da presença de HPV na mucosa cervical (Thun *et al.*, 2010).

1.3 Carcinogênese cervical

1.3.1 Controle do ciclo celular

Para melhor compreensão do mecanismo de ação do HPV no desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais e do câncer cervical é necessário conhecer o processo de controle do ciclo celular, que é dividido classicamente em quatro fases: G1 (*gap 1*), quando a célula se prepara para a duplicação do DNA; S (síntese), momento da duplicação do DNA; G2 (*gap 2*) estágio em que a célula se prepara para a divisão; M (mitose), quando ocorre a divisão celular (Silva BV *et al.*, 2009). As células-filhas podem reiniciar o ciclo celular entrando novamente em G1,

ou alternativamente podem sair do ciclo temporária ou definitivamente (G0), quando passam a se diferenciar (Bahnassy *et al*, 2007).

O ciclo celular consiste em uma série complexa de eventos altamente regulados que culminam com a duplicação do DNA e divisão da célula. Existem pontos estratégicos de checagem (*checkpoints*), nos quais há uma parada deste processo para que a célula possa verificar e corrigir eventuais erros. Estes pontos de verificação impedem que a célula entre na próxima fase do ciclo mitótico antes que todos os requisitos da fase precedente sejam atendidos. O primeiro é chamado ponto de checagem G1/S, está localizado no final da fase G1, antes do início da fase S, e garante que o DNA a ser duplicado não apresenta erros em sua sequência. O segundo ponto de checagem é o G2/M, que se localiza no final de G2, imediatamente antes do início da fase M, e é quando se verifica se todos os fatores celulares necessários à divisão celular estão presentes, ou seja, se a célula está pronta para a divisão. O terceiro chama-se ponto de checagem do fuso mitótico e ocorre na metáfase, quando os cromossomos estão alinhados na placa equatorial, garantindo que a divisão aconteça de maneira correta (Baldi *et al*, 2011).

A regulação do ciclo celular é feita sobretudo por duas classes de proteínas: ciclinas e quinases dependentes de ciclina - CDK (de *Cyclin Dependent Kinases*). As ciclinas se ligam às CDKs e controlam a fosforilação de proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular. As ciclinas (identificadas como A, B, D, E) são assim denominadas por serem produzidas e degradadas de forma cíclica nas diferentes etapas do ciclo celular e cada complexo ciclina-CDK regula determinada fase do ciclo: ciclina D/CDK4 e ciclina D/CDK6 são responsáveis pela progressão na fase G1: ciclina E/CDK2 é necessário para a progressão da fase G1 a S; ciclina A/CDK2 é importante para a transição de S e ciclina B/CDK1 atua na transição G2/M (Silva BV *et al.*, 2009).

Um exemplo da importância dos complexos ciclinas-CDKs para a progressão do ciclo celular é observado na transição G1/S. A proteína Rb, na sua forma ativa e hipofosforilada, encontra-se associada ao fator de transcrição E2F, formando o complexo E2F/pRb. O ciclo celular se inicia com a presença do complexo ciclina D1/CDK 4-6, que ao fosforilar a proteína Rb libera o fator E2F e permite a atividade transcricional, com consequente ativação de genes necessários para a fase S. Após ativação do complexo ciclina/CDK, a ciclina é degradada no sistema ubiquitina-proteassomas (Payton & Coats, 2002; Spierings *et al.*, 2003) (Figura 4).

Outro grupo importante de proteínas que controlam o ciclo celular através da regulação negativa dos complexos ciclina/CDK é constituído por inibidores de CDKs - CDKI (*Cyclin Dependent Kinases Inhibitors*). A família de inibidores INK4 (*INhibitor of cyclin-dependent Kinase 4*) inclui as proteínas p16(INK4A), p15(INK4B), p18(INK4C) e p19(INK4D), que inibem especificamente o complexo ciclina D/CDK4 (Figura 4). Já os membros da família CIP/KIP, p21(WAF1), p27(KIP1) e p57(KIP2), inibem a atividade de ciclinaE/CDK2, ciclina A/CDK2, ciclina B/CDK1 e, menos efetivamente, ciclina D/CDK4 (Bahassy *et al.*, 2007; Silva BV *et al.*, 2009) (Figura 4).

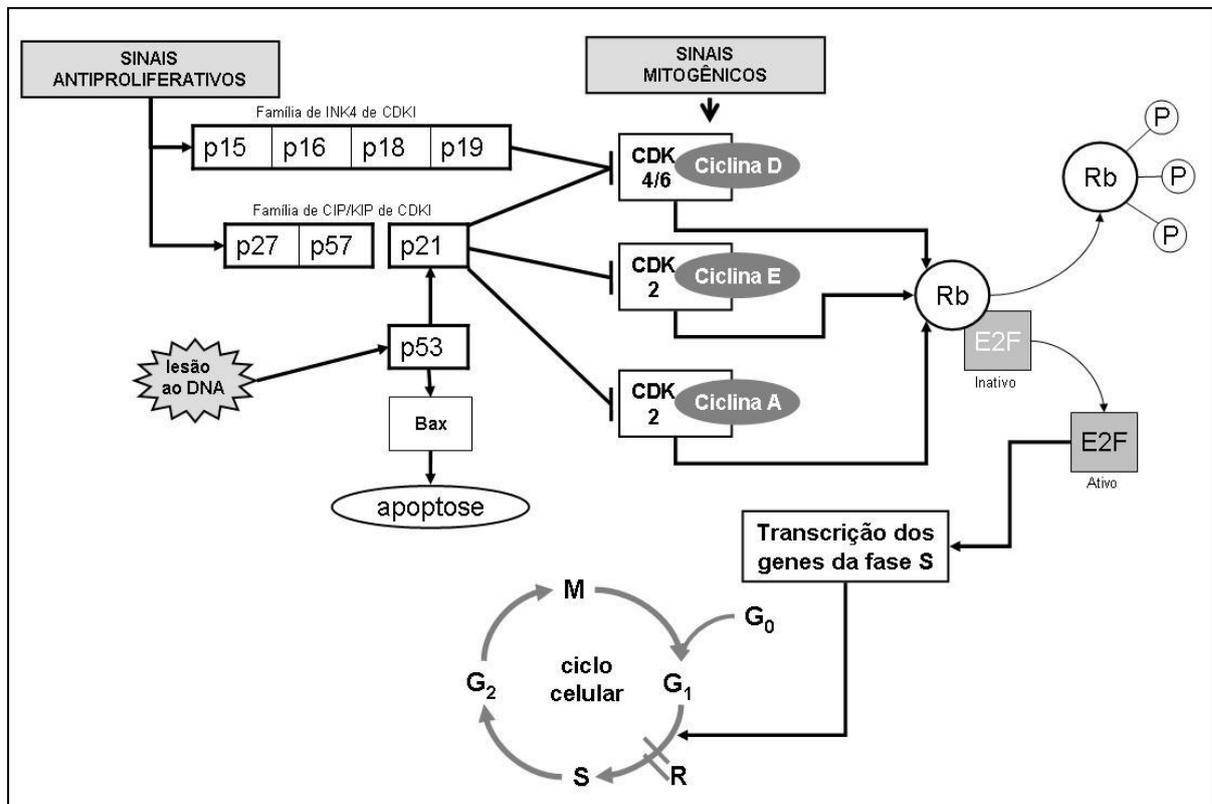


Figura 4: Controle do ciclo celular. Ativação dos complexos ciclina/CDK e sua regulação pelas duas famílias de inibidores de quinases dependentes de ciclina (Modificado de Spierings *et al.*, 2003).

Em resposta a vários tipos de injúria celular (tais como: dano do material genético, hipóxia, estresse metabólico e ativação de oncogenes), o ciclo celular normal é interrompido por meio da ativação da p53. A proteína p53 é uma proteína supressora de tumor considerada “guardiã do genoma”, por ter papel importante na manutenção da estabilidade do DNA. Uma das principais funções da p53 é a indução da parada do ciclo celular nos pontos de checagem G₁/S e G₂/M do ciclo celular

quando há dano no material genético. Neste caso, a p53 ativa é capaz de transativar outros genes, em especial o gene *p21*, que codifica a proteína p21(WAF1). A p21 se liga a complexos ciclina/CDK e inibe as suas atividades de quinase, impedindo, por exemplo, a fosforilação da pRb, com conseqüente parada do ciclo celular na transição G1/S (Vousden & Lane, 2007; Levine & Oren, 2009) (Figura 4). Este fato permite que haja tempo suficiente para que ocorra o reparo. Além disso, a proteína p53 pode também atuar de forma direta no reparo do DNA danificado ao induzir a transcrição da proteína GADD45 (Garner & Raj, 2008). Outra importante função da p53 é induzir a apoptose (Figura 4) nos casos em que o dano é irreversível, sendo este o último mecanismo de proteção celular contra a transformação neoplásica. A p53 ativa diretamente a transcrição de proteínas pró-apoptóticas, como BAX e PUMA, que favorecem a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, com subsequente ativação da cascata de caspases (Vousden & Lane, 2007; Whibley *et al.*, 2009).

1.3.2 HPV e carcinogênese cervical

O genoma dos papilomavírus é constituído por uma molécula de DNA de dupla fita circular de 6.800 a 8.000 pares de bases, que pode ser dividida em três regiões: a região de genes de expressão precoce – E (*Early*) (~4 kb), a região de genes de expressão tardia – L (*Late*) (~3 kb) e a região longa de controle – LCR (*Long Control Region*) (~1 kb) (Burd, 2003). A região E contém seis genes, *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, que codificam proteínas não estruturais envolvidas em múltiplas funções, como transativação da transcrição, replicação viral, adaptação a diferentes ambientes celulares e transformação. Na região L, encontram-se os genes *L1* e *L2*, que codificam as proteínas do capsídeo viral, sendo *L1* a principal proteína do capsídeo. A região longa de controle, não codificadora, contém diversos elementos *cis* responsáveis pela regulação da replicação viral e da expressão gênica (zur Hausen, 2002; Münger *et al.*, 2004; Doobar, 2006) (Figura 5).

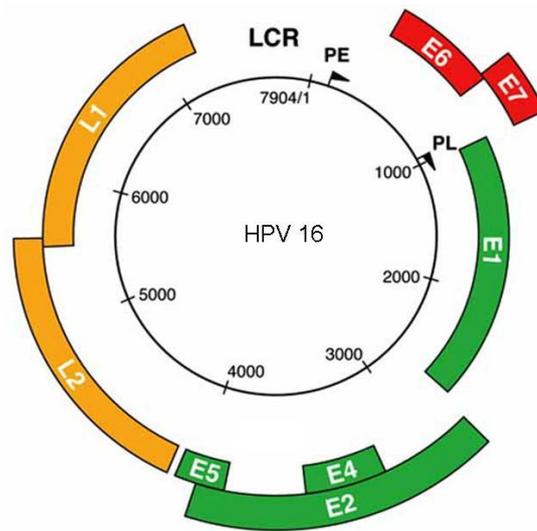


Figura 5: Genoma do HPV 16. Genes de expressão precoce, E1, E2, E4, E5, E6 e E7, genes de expressão tardia, L1 e L2, a região longa de controle (LCR), Promotor dos genes de expressão precoce (PE) e Promotor dos genes de expressão tardia (PL) (Modificado de Doobar, 2006).

Diferentemente de outros vírus, os vírus do papiloma humano apresentam um ciclo de vida (processo de replicação viral) intrinsecamente ligado ao programa de proliferação e diferenciação da célula epitelial infectada (Doobar, 2006). Em geral, após a infecção inicial, que ocorre provavelmente em local de erosão da mucosa escamosa, o HPV necessita atingir as células da camada basal, as únicas com capacidade proliferativa (mitose), que se diferenciam e ascendem em direção à superfície da mucosa, local em que ocorre a síntese de novas partículas virais. Este tipo de infecção produz apenas lesões produtivas e não está associada a neoplasias malignas. Enquanto as células infectadas se encontram no compartimento proliferativo do epitélio (camada basal), o genoma viral se apresenta sob a forma episomal (elemento extra-cromossômico), não integrado ao genoma da célula hospedeira, havendo expressão das proteínas de replicação viral E1 e E2 e mínima expressão das proteínas E5, E6 e E7 (Doobar, 2006, Moody & Laimins, 2010). A função da proteína E1 está relacionada à replicação viral e a proteína E2 tem várias funções durante a infecção produtiva, tais como iniciação da replicação viral, segregação do genoma e controle da região de expressão precoce (Doobar, 2006).

Após a infecção inicial, quando há menos de 10 cópias de DNA viral por célula, inicia-se um ciclo de replicação do DNA viral nas células basais, possivelmente independente do ciclo celular, que eleva para cerca de 50 a 100

cópias por célula. Quando as células escamosas basais entram na fase de diferenciação há aumento expressivo da síntese das proteínas virais E1, E2, E4 e E5, o que resulta em amplificação do genoma viral, chegando até 1000 cópias por célula (Bishop *et al.*, 2007). Neste momento, também é observada expressão acentuada de E6 e E7 e dos genes tardios L1 e L2, o que permite o empacotamento do genoma viral e a formação das partículas virais nas camadas mais superficiais da mucosa escamosa para posterior liberação. Essas partículas podem reinfectar outras células da mucosa adjacente (Bishop *et al.*, 2007).

Visto que o HPV se utiliza do sistema de replicação do DNA do hospedeiro e depende da atividade mitótica dessas células, as proteínas virais E6 e E7 induzem a reativação da síntese de DNA aumentando o número de células no compartimento proliferativo. Este efeito é potencializado pela ação das proteínas E1 e E2 em estimular a replicação viral, e conseqüentemente induz à perda da capacidade de diferenciação celular, que é morfológicamente identificada como displasia (Doorbar, 2006). Outra função das proteínas virais E6 e E7 é inibir a apoptose dessas células escamosas morfológicamente alteradas (Stanley, 2008).

O mecanismo básico e com maior poder transformador através do qual o HPV estimula a progressão do ciclo celular depende da ação da oncoproteína E7, principalmente a dos HR-HPV, que tem capacidade de se ligar à pRb e romper o complexo E2F-pRb, independentemente de estímulos externos de proliferação. Conseqüentemente, o fator de transcrição E2F livre transativa proteínas celulares necessárias à replicação do DNA. A proteína E7 também se associa com outras proteínas envolvidas no ciclo de proliferação celular, incluindo fatores de transcrição, outros reguladores do ciclo celular (ciclina A e E e os inibidores de CDK como p21(WAF1), p27(KIP1), enzimas metabólicas e enzimas modificadoras da cromatina, em especial, as desacetilases e as acetiltransferases de histona (Cho *et al.*, 2002; Doorbar, 2006; Shin, 2009).

A função da oncoproteína E6, em especial a de HR-HPV, é complementar à da E7, visto que sua principal ação é se ligar à proteína p53 e mediar a sua degradação via ubiquitinação em proteossomas (Scheffner *et al.*, 1993). Deste modo, há comprometimento das funções da p53, tais como parada do ciclo celular ou indução da apoptose, em resposta à ação indireta de E7, que mantém o estímulo de replicação das células mais superficiais da mucosa escamosa. Uma possível explicação para esse efeito sinérgico recai no fato de que, apesar da proteína

p16^{INK4a} se contrapor a ação da proteína E6, a proteína E7 ativa diretamente as ciclinas A e E, ignorando o efeito inibidor de crescimento da p16 (zur Hausen, 2002; Doorbar, 2006). Além disto, a E6 também atua inibindo a apoptose por se associar às proteínas Bak e Bax, comprometendo, assim, a eficácia da resposta quando há dano no DNA celular e permitindo o acúmulo de mutações secundárias (Doorbar, 2006; Jayshree *et al.*, 2009). Outras ações importantes da E6 é a sua capacidade de ativar a subunidade catalítica da telomerase – hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), que adiciona repetições de hexâmeros à extremidade telomérica dos cromossomos (Doorbar, 2006).

Os diferentes tipos de lesão cervical causados pela infecção do HPV (condiloma plano, LSIL, HSIL ou carcinoma invasor) refletem alterações moleculares no programa normal de diferenciação epitelial, que é dependente da expressão ordenada e temporal dos genes virais nos diferentes níveis da mucosa escamosa. As lesões de baixo grau refletem a fase de infecção produtiva, na qual o genoma viral se encontra sob a forma epissomal e há elevada expressão das proteínas de replicação viral E1 e E2. Nas lesões de alto grau, a parada da maturação do epitélio escamoso, ou a falta de diferenciação, não permite a replicação efetiva do DNA do HPV que, nestes casos, encontra-se baixa, com a amplificação do genoma viral ocorrendo próximo à superfície epitelial e associada ao retardo da expressão das proteínas do capsídeo (Münger *et al.*, 2004; Doorbar, 2006). O evento transformante nas lesões de alto grau corresponde à integração do genoma viral no genoma do hospedeiro com perda de sua capacidade de se replicar de maneira autônoma. Apesar de existirem sítios frágeis de integração no genoma humano, parece não existir pontos preferenciais (“*hot spots*”) (Doorbar, 2006).

Neste processo de integração, ocorre a clivagem do genoma do HPV, normalmente na parte interna do gene *E2*, com deleção completa dos genes *E4* e *E5* e deleção parcial dos genes *E2* e *L2* (Doorbar, 2006). A ausência do gene viral *E2*, responsável pela produção da proteína E2 que tem a capacidade de controlar a expressão das proteínas virais E6 e E7, promove instabilidade genética com desregulação do ciclo celular e progressão maligna. Sendo assim, a expressão dos genes *E6* e *E7* se mantém, e existem evidências de maior estabilidade dos mRNAs desses genes após a integração. Dessa forma, as células que expressam os genes *E6* e *E7* a partir de sequências integradas de HPV exibem uma vantagem de crescimento em relação às células com genoma de HPV sob a forma epissomal, o

que contribui para a transformação maligna das células (Münger *et al.*, 2004; Doorbar, 2006; Stanley *et al.*, 2007).

Kadaja e colaboradores (2009) apontam ainda para a importância da combinação perigosa da presença de partículas episomais e integradas de HPV para a carcinogênese cervical. A existência concomitante das duas formas levaria à instabilidade genômica devido ao estímulo de replicação mantido pelas proteínas E2 e E1 (partículas episomais) em uma célula com HPV integrado, que, nesta condição expressaria níveis mais elevados das proteínas E6 e E7. Essa situação pode ocorrer durante a infecção primária quando um dentre vários genomas de HPV sob a forma episomal acidentalmente se integra ao genoma da célula hospedeira, ou em uma coinfeção, tornando a célula apta à progressão clonal.

1.4 Biomarcadores das lesões neoplásicas do colo uterino

Como mencionado no item 1.1, a proposição de um método de diagnóstico baseado na análise citológica das lesões da cérvix uterina representou um avanço no controle, tratamento e prognóstico do câncer cervical. Até a década de 1990, o teste de Papanicolaou convencional constituiu-se na principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados ao controle do câncer de colo uterino no mundo. No entanto, com as fortes evidências da importância da infecção por HPV para a carcinogênese cervical, outros métodos têm sido propostos, uma vez que o exame citológico não permite a diferenciação entre lesões causadas por tipos de HPV de alto risco oncogênico, essenciais para a carcinogênese cervical, ou os de baixo risco oncogênico (Solomon *et al.*, 2002). Dentre os novos métodos de rastreamento, destacam-se os testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo uterino, utilizando-se ácido acético ou lugol. Estes são apontados em vários estudos como de maior sensibilidade e, portanto, mais eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer de colo uterino por sua maior capacidade de detecção de lesões em seus estágios iniciais (zur Hausen, 2002).

Embora o exame histopatológico convencional com a coloração da hematoxilina e eosina (HE) ainda seja o padrão-ouro para o diagnóstico das lesões suspeitas biopsiadas, os casos de difícil diagnóstico e a grande variabilidade interobservador relatados na literatura (Vinyuat *et al.*, 2008; Bergeron *et al.*, 2010)

ênfatizam a necessidade da utilização de biomarcadores como ferramenta adjunta no diagnóstico e/ou prognóstico cito e histopatológico de lesões cervicais.

O epitélio cervical é um tecido dinâmico em que as células escamosas se proliferam e diferenciam, movendo-se da camada basal até a superfície de modo ordenado e controlado. O diagnóstico histopatológico das lesões cervicais pode dar a falsa impressão de que NIC/SIL seja um evento estático, quando, de fato, trata-se de um processo dinâmico, que pode progredir, persistir ou regredir. Isto ênfatiza a necessidade de tornar a interpretação morfológica estática atualmente empregada em um modo mais dinâmico. A técnica da imunohistoquímica possibilita avaliar a expressão de determinadas proteínas em células das diferentes camadas do tecido, constituindo uma ferramenta importante para aumentar a acurácia do diagnóstico histopatológico. É de fundamental importância definir entre mucosa atrófica ou com lesões reacionais com atipias regenerativas ou metaplasia escamosa imatura de lesões displásicas (NIC), bem como diferenciar as lesões intraepiteliais de baixo grau das de alto grau, visto que a conduta terapêutica é diferenciada (Horn *et al.*, 2008; Bergeron *et al.*, 2010). Além disso, seria interessante obter informações adicionais como previsão do risco de progressão das lesões de baixo grau e da possibilidade de regressão ou persistência das lesões de alto grau (Baak *et al.*, 2006; Galgano *et al.*, 2010; Hwang & Shroyer, 2012).

Visto que as neoplasias intraepiteliais cervicais correspondem à disfunção progressiva da proliferação e da diferenciação das células epiteliais cervicais, muitos estudos têm focado na avaliação de proteínas relacionadas à proliferação e à diferenciação celular. As proteínas mais frequentemente avaliadas são aquelas envolvidas no controle do ciclo celular, tais como p16, p53, p21 e ciclinas (Klaes *et al.*, 2002; Baak *et al.*, 2005; Kumar & Verma, 2006; Bergeron *et al.*, 2010; Hwang & Shroyer, 2012).

Considerando que o processo de carcinogênese cervical está fundamentado nas ações diretas e indiretas das oncoproteínas virais E6 e E7 sobre as proteínas p53 e p21, que têm fundamental importância no controle do ciclo celular, suas peculiaridades estruturais e de níveis de expressão nas neoplasias cervicais serão detalhadas no item 1.5.

Como mencionado anteriormente, a proteína p16^{INK4} pertence à família INK4 de inibidores de CDK que ao se ligar à CDK4 e CDK6, inibe a interação destas CDK com a ciclina D1, impedindo assim a fosforilação da pRb e liberação do fator de

transcrição E2F. Estudos têm demonstrado que a degradação da pRb pela proteína E7 do HPV resulta em hipometilação do promotor da p16^{INK4}, e consequente superexpressão de p16^{INK4} (Snijders *et al.*, 2006; Dehn *et al.*, 2007). Análise imunohistoquímica tem demonstrado que positividade difusa e forte para p16^{INK4} está presente em quase todos os casos de lesões de alto grau e câncer associados à infecção pelos HPV de alto risco ou risco intermediário, e raramente detectada nos casos de lesão de baixo grau (que quando positiva exibe coloração fraca e focal) ou mucosa escamosa normal (Klaes *et al.*, 2002; Bahnassy *et al.*, 2007). Deste modo, imunomarcagem para p16^{INK4} tem sido usada com sucesso como marcador de neoplasia intraepitelial de alto grau ou câncer cervical e é considerado marcador específico de superexpressão de HPV-E7 ou outro evento que iniba a proteína Rb (Redman *et al.*, 2008; Galgano *et al.*, 2010; Hwang & Shroyer, 2012). Alguns estudos recentes demonstraram que a imunomarcagem para p16^{INK4} também pode ter valor prognóstico no câncer cervical. (Schwarz *et al.*, 2011; Huang & Lee 2012).

Com relação à ciclina D1, os resultados obtidos nos diversos estudos se mostram discordantes. Alguns autores observaram diminuição da sua expressão nos casos de NIC III e carcinoma invasor, quando comparados com controles normais e NIC I (Bae *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002; Vijayalakshmi *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2010), enquanto em outros estudos foi observada a superexpressão de ciclina D1 nas lesões cervicais de maior severidade (Nichols *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 2001; Bahnassy *et al.*, 2007; Conesa-Zamora *et al.*, 2009).

A expressão de Ki-67 também é comumente avaliada, uma vez que ele é um eficiente marcador de proliferação celular, correspondente a uma proteína não-histona expressa no núcleo em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 e G1 inicial (Kruse *et al.*, 2004). Outras proteínas avaliadas são as relacionadas ao processo de diferenciação do epitélio escamoso, sendo expressas nas células escamosas maduras em diferenciação, tais como citoqueratinas 13 e 14 (Baak *et al.*, 2006).

1.5 As proteínas p53 e p21 como biomarcadores das neoplasias cervicais

1.5.1 A proteína p53

A proteína p53, assim denominada por ter peso molecular de 53 kDa, é composta por 393 aminoácidos e apresenta 5 domínios (Toledo & Wahl, 2006) (Figura 6). O domínio de transativação N-terminal (TAD – *N-terminal transactivation domain*) engloba os resíduos de aminoácidos 1 - 40 e é importante para a estabilização e ativação transcricional da p53. Essa primeira sequência de aminoácidos possui muitos resíduos conservados de serina, treonina e lisina e contém um sítio de ligação da MDM-2 (*Murine Double-Minute 2*), um regulador negativo da p53. Adjacente ao TAD existe o domínio rico em prolina (PRD – *proline-rich domain*), que é composto pelos resíduos de aminoácidos 61 – 94 e contém cinco motivos PXXP. Esse domínio permite interações entre proteínas, sendo considerado um potente elemento conformacional, com participação na regulação da estabilidade e atividade da p53. O domínio central de ligação de DNA (DBD – *DNA binding-domain*) é formado pelos resíduos de aminoácidos 100 - 300, sendo a região mais conservada da proteína e o local de reconhecimento dos elementos nos promotores dos genes alvos. Os outros dois domínios são: o domínio de tetramerização (4D – *tetramerization domain*), constituído pelos resíduos 324 a 355, e o domínio regulatório C-terminal (CTD – *C-terminal domain*), composto pelo resíduos 360 a 393. Entre os domínios de ligação de DNA e o domínio de tetramerização há uma pequena região, designada de L, com função de localização nuclear. Um sinal de exportação nuclear, referido como E, é observado dentro do domínio 4D. A proteína p53 se liga ao DNA em forma de tetrâmero e a formação desta estrutura depende da correta ativação da p53 e de modificações pós-traducionais no domínio 4D (região de tetramerização) (Toledo & Wahl, 2006)



Figura 6: A fosfoproteína p53. Ilustração de sua estrutura, com 393 aminoácidos, representando os seus cinco domínios: TAD (Domínio de transativação N-terminal), PRD (Domínio rico em prolina), DBD (Domínio ligante de DNA), 4D (Domínio de tetramerização) e CTD (Domínio regulatório C-terminal). (Modificado de Petitjean *et al.*, 2007 - acessado em 05 de maio de 2012).

Nas células normais, apesar da p53 ser continuamente sintetizada sua meia-vida é curta (cerca 6 a 20 minutos). Isto se deve à regulação negativa exercida pela proteína MDM-2, que se liga à extremidade N-terminal e promove a sua degradação através da ubiquitinação, que ocorre na extremidade C-terminal (Bond *et al.*, 2005). Nos casos de estresse celular, a p53 é ativada e se estabiliza através de eventos de fosforilação de serinas e treoninas localizadas no domínio TAD. A fosforilação destes resíduos de aminoácidos, especificamente serina 15, treonina 18 e serina 20, bem como a fosforilação na região do domínio rico em prolina, reduzem a capacidade de ligação da MDM-2 no seu sítio específico e, conseqüentemente, a p53 se acumula e forma tetrâmeros que tendem a permanecer dentro do núcleo. Além destes eventos, a fosforilação da TAD favorece a interação da p53 com acetiltransferases de histona (como p300), que se ligam aos motivos PXXP localizados no domínio rico em prolina. Estas ligações favorecem a acetilação de lisinas no domínio regulatório C-terminal, o que promove a estabilização e o aumento das ligações específicas da p53 com os genes alvos (Toledo & Wahl, 2006).

Desse modo, a p53 ativa modula a transcrição de mais de 100 genes, participando, assim, do controle da proliferação celular (Riley *et al.*, 2008) e da regulação da angiogênese, da senescência, de genes da apoptose e da transcrição do gene *MDM2* (Vogelstein & Kinzler, 1992; Whibley *et al.*, 2009).

1.5.2 A proteína p21

A proteína p21(WAF1), com peso molecular de 21 kDa, é composta por 165 aminoácidos e possui dois domínios de ligação. O domínio N-terminal se liga a complexos ciclina-CDK, inibindo suas funções. Já o domínio C-terminal se liga ao PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), interferindo na atividade das DNA polimerases δ e ϵ , além de várias outras proteínas envolvidas na síntese do DNA, e inibindo, desse modo, a replicação do DNA e sua modulação nos processos de reparo. A proteína p21 também participa nos processos de desenvolvimento e diferenciação celular, apoptose, senescência e tumorigênese, podendo atuar inclusive como oncogene (Cho *et al.*, 2002; Abbas & Dutta, 2009).

Como citado anteriormente, a expressão do gene *p21(WAF1/CIP1)* é regulada pela proteína supressora de tumor p53, que se liga a um sítio localizado a 2,4 kb acima da região codificadora. A proteína p21(WAF1), pertencente à família CIP/KIP

de CDKs, inibe os complexos ciclina D/CDK4-6, ciclina E/CDK2 e ciclina A/CDK1 e, portanto, a fosforilação de seus substratos. Dessa forma, impede a progressão do ciclo celular, tanto na transição G1/S como na transição G2/M. Desse modo, a célula apresentando algum tipo de lesão no seu DNA tem a chance, por meio da ativação de outras vias, de reparar o dano celular ou sofrer apoptose, impedindo, assim, a propagação de alterações genéticas com potencial carcinogênico para as células filhas (Abukhdeir & Park, 2008).

Além da ativação p53-dependente em resposta a algum tipo de dano celular, o gene p21 também é regulado por outros sinalizadores, como fatores de crescimento TGF- β , oncoproteína E7 dos HPVs de alto risco, MYOD1 (*myoblast determination protein 1*), receptores de retinoide, receptores de vitamina D, receptores de androgênio, drogas anti-neoplásicas (inibidores de histonas acetiltransferases e de histonas desacetilases), drogas anti-proliferativas (estatinas), MYC, entre outros (Cho *et al.*, 2002; Ocker & Schneider-Stock, 2007; Abbas & Dutta, 2009).

Apesar da maioria dos mecanismos de controle da proteína p21 ocorrer ao nível da transcrição, foi relatado que o controle pós-transcricional também tem grande relevância. Nas células em divisão, observa-se que a proteína p21 é instável, com meia-vida em torno de 20 a 60 minutos, e a p21 recém-sintetizada torna-se estável ao formar complexos triméricos com WISp39 e hsp90, que a protegem da degradação via proteassoma (Jascur *et al.*, 2005). A proteólise da p21 é mediada por complexos de ubiquitina ligase somente quando ela está ligada aos complexos ciclina E/CDK2 e ciclina A-B/CDK1 ou PCNA (Abbas & Dutta, 2009). A p21 que não está ligada a complexos ciclina/CDK ou PCNA é degradada via proteassoma 20S, porém isto não ocorre em todos os tipos de células (Sheaff *et al.*, 2000).

1.5.3 Expressão das proteínas p53 e p21 nas neoplasias cervicais

Na mucosa escamosa normal da cérvix uterina, devido a uma meia-vida curta, as proteínas p53 e p21 não são detectáveis por imunohistoquímica ou são detectadas em níveis baixos, até 5%, nos núcleos das células basais e suprabasais, respectivamente (Troncone *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001). Nas neoplasias cervicais associadas à infecção por HPV, por causa dos efeitos das oncoproteínas E6 e E7, que são capazes de interferir direta ou indiretamente nas atividades

funcionais de p53 e p21, espera-se que estas proteínas estejam ausentes ou apresentem níveis ainda menores expressões. Entretanto, em vários casos de neoplasia cervical de diferentes graus, observa-se também superexpressão dessas proteínas (Santopietro *et al.*, 2006).

Em vários tipos de câncer associados à mutação do gene *TP53*, a superexpressão de p53 pode ser explicada pelo fato dos altos níveis de imunopositividade para p53 corresponder ao acúmulo intranuclear anormal de uma proteína p53 mutada, com perda da capacidade de ativação transcricional da MDM2. Consequentemente, a proteína p53 mutada apresenta maior estabilidade e sua meia-vida pode ser de até seis horas (Hall & McCluggage, 2006; Robles & Harris, 2010). Já nas neoplasias cervicais a oncoproteína E6 do HPV age diretamente sobre a proteína p53, estimulando a sua degradação. Porém, a expressão aumentada da proteína p53 observada nesses casos poderia resultar da ação da oncoproteína E6 que inativa a proteína p53 normal, tornando-a incapaz de regular o ciclo celular e a apoptose. Uma das explicações sugeridas por Akasofu & Oda (1995) é que a oncoproteína E6 pode interferir na função normal da proteína p53, anulando a sua capacidade de ativação e repressão transcricional. Essa proteína p53 inativa, expressa de modo excessivo, provavelmente tem suas funções alteradas, é incapaz de regular o ciclo celular e a apoptose e, ao formar complexos com outras proteínas, não é completamente degradada pelo sistema protease.

Os inúmeros estudos de associação de expressão de p53 e o câncer cervical descritos na literatura apresentam resultados controversos. Em um dos primeiros estudos de avaliação de expressão não apenas de p53, como também de p21, em amostras de tecido normal, lesões precursoras de baixo e alto grau e carcinoma infiltrante da cérvix uterina, observou-se negatividade para p53 em todos os casos normais e de lesões precursoras e positividade focal em alguns casos de câncer (Werness *et al.*, 1997). Alguns autores observaram a expressão da proteína p53 em lesões intraepiteliais cervicais de alto grau e carcinoma invasivo ou apenas em carcinoma invasivo (Dimitrakakis *et al.*, 2000; Giarnieri *et al.*, 2000; Clarke & Chetty, 2001; Huang *et al.*, 2001, Bahnassy *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010). Outros observaram maior expressão da proteína p53 em lesões de baixo grau (NIC I) do que em lesões de alto grau (NIC II / NICIII), sugerindo um papel protetor da p53 nas lesões precoces da cérvix (Vassalo *et al.*, 2000, Liang *et al.*, 2010). Outro resultado observado na literatura é a superexpressão de p53 em todos os tipos de neoplasias

cervicais sem diferença significativa entre os grupos, indicando que a p53 não é um bom marcador para distinguir os graus das neoplasias cervicais (Conesa-Zamora *et al.*, 2009; Tosun *et al.*, 2010). Em alguns trabalhos foi observada ainda a correlação significativa entre a infecção por HPV e a expressão de p53 (Grace *et al.*, 2003), porém em outros não se observou associação entre a expressão da proteína p53 e os diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical ou o tipo de HPV (Skomedal *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 2001; Bragança *et al.*, 2008; Conesa-Zamora *et al.*, 2009; Tosun *et al.*, 2010).

No trabalho de Huang e colaboradores (2001), em que a expressão de p53 e p21 foi avaliada em lesões de baixo e alto grau e carcinoma cervical invasivo, observou-se a redução da expressão de p21 e o aumento significativo da expressão de p53 com o grau de malignidade. Os autores sugeriram o potencial de uso da proteína p53 como um indicador de prognóstico ruim. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos (Ishikawa *et al.*, 2001; Tjalma *et al.*, 2001; Bahnassy *et al.*, 2007). Em um estudo em que se avaliou especificamente adenocarcinoma cervical, também foi demonstrada a superexpressão da p53, que se correlacionou com um desfecho desfavorável (Suzuki *et al.*, 2004). No entanto, em dois estudos de seguimento, que tiveram por finalidade a identificação de um possível marcador biológico de valor prognóstico para as lesões do colo uterino de alto grau, foi observada a correlação entre a persistência de HSIL e baixos níveis de imunomarcação para p53, e também para pRb, na metade inferior da espessura do epitélio observados na metade inferior da espessura do epitélio escamoso (Baak *et al.*, 2005; Øvestad *et al.*, 2011). Já em outros estudos não se observou qualquer correlação entre prognóstico do câncer cervical e a expressão de p53 (Dimitrakakis *et al.*, 2000; Graflund *et al.*, 2002; Wootipoom *et al.*, 2004; Ikuta *et al.*, 2005; Rajaram *et al.*, 2006; Khunamornpong *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010; Hanprasertpong *et al.*, 2010).

Os vários trabalhos de expressão da proteína p21 em neoplasias cervicais também apresentam resultados conflitantes. Os primeiros estudos avaliando a expressão conjunta de p21 e p53 em casos de neoplasias intraepiteliais cervicais e câncer revelaram expressão aumentada de ambas as proteínas. No entanto, a expressão de p21 foi maior e o padrão de positividade não se correlacionou com o da p53, permitindo que os autores sugerissem que a expressão de p21 fosse independente do estímulo da p53 (Werness *et al.*, 1997; Troncone *et al.*, 1998). Tal

observação está em acordo com o fato de que a p21 pode ser ativada por vários estímulos, dependente e independentemente da p53 (Abbas & Dutta, 2009). A superexpressão de p21 nos casos de HSIL e câncer cervical foi observada por vários autores (Lu *et al.*, 1998; Skomedal *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2001; Cheung *et al.*, 2001; Milde-Langosch *et al.*, 2001; Graflund *et al.*, 2004; Santopietro *et al.*, 2006; Bahnassy *et al.*, 2007). De modo inverso, Huang e colaboradores (2001) observaram expressão reduzida de p21 nos casos de carcinoma microinvasor e invasivo. Visto que a p21 exerce função de supressão tumoral, os autores sugeriram que a sua inativação pode corresponder a um evento precoce na carcinogênese cervical. Em estudo ainda mais recente, cujo objetivo foi correlacionar a expressão de p53, p21 e p27 com tipos de HPV em amostras de câncer cervical e tecido normal, observou-se expressão diminuída de p21 nos casos de carcinoma cervical positivos para HPV 18 (Huang *et al.*, 2010). Já nos estudos envolvendo adenocarcinoma de colo uterino e endométrio foi observada associação entre positividade de p21 e estágios mais avançados nos casos de adenocarcinoma cervical, que apresentaram infiltração do miométrio e metástase linfonodal (Backer *et al.*, 2011).

Embora o potencial de uso de inibidores de CDKs como indicadores de prognóstico para diversos tipos de câncer esteja sendo investigado, os resultados da maioria dos trabalhos envolvendo lesões precursoras e câncer de colo de útero não permitem evidenciar a importância da proteína p21 (Alfsen *et al.*, 2003; Bahnassy *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2009).

Devido ao fato das proteínas p53 e p21 desempenharem funções essenciais à manutenção da integridade do genoma e regulação do ciclo celular, suas concentrações e atividades são reguladas e mantidas sob um rígido controle. Nos casos de câncer de colo uterino estes dois genes supressores de tumor, que interagem biologicamente no ciclo celular, raramente apresentam mutações (Tsihlias *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2011). Embora os níveis das proteínas p53 e p21 se encontrem comumente alterados nas neoplasias intraepiteliais e câncer cervical (Troncone *et al.*, 1998; Alfsen *et al.*, 2003; Berlin Grace *et al.*, 2009), não é possível definir um padrão de imunomarcacão visto que os resultados são muito divergentes, o que nos faz pensar que pode haver outros fatores atuando no processo da carcinogênese cervical, tais como tipo de HPV, resposta imune do hospedeiro e fatores genéticos.

Como as oncoproteínas E6 e E7 do HPV causam alterações nas funções normais do ciclo celular, interferindo nas duas vias principais de controle (p53 e pRb), as variantes polimórficas das proteínas reguladoras, direta ou indiretamente afetadas pelas proteínas virais, poderiam se comportar como modificadores do risco da infecção pelo HPV para o câncer de colo do útero (Mousses *et al.*, 1995).

1.6 Polimorfismos no gene *TP53* e as neoplasias cervicais

O gene *TP53*, que codifica a proteína p53, está localizado, em humanos, na região 13.1 situado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (OMIM *191170) (Figura 6), sendo constituído por 11 éxons e 10 íntrons. O éxon 1 representa uma sequência não codificante. No éxon 2, existem dois sítios putativos para o início da transcrição, e o éxon 11 contém o códon de terminação (IARC – *TP53 database*). Atualmente, sabe-se que, devido a diferentes inícios de transcrição e a *splicing* alternativo, o gene *TP53* pode produzir até nove isoformas da proteína p53. Algumas delas são observadas em diferentes tecidos e estágios do desenvolvimento, porém a função precisa de cada isoforma identificada ainda é desconhecida (Levine & Oren, 2009).

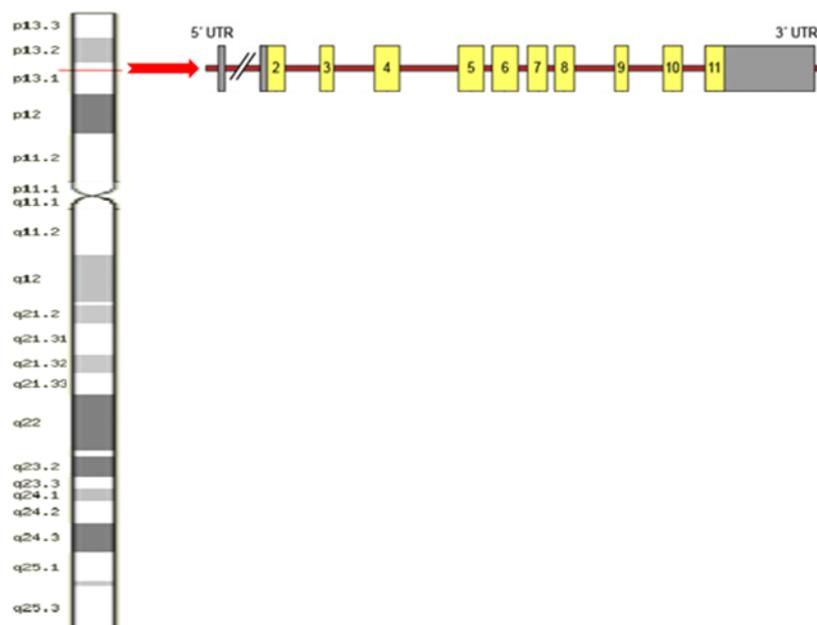


Figura 7: Cromossomo 17 e o gene *TP53*. Esquema evidenciando as subregiões no cromossomo 17, a localização do gene *TP53* (17p13.1) e o gene *TP53*, com 11 éxons (Modificado de GeneCards® - The Human Gene Compendium: tumor protein p53, 2009 e Stjude.org - <i>TP53</i> Gene).

Pelo fato da proteína p53 ter a função de manter a integridade do genoma, através de múltiplas ações, o gene *TP53* é o alvo mais comum de alteração genética nos tumores humanos. Em cerca de 50% dos casos de vários tipos de câncer em humanos, observa-se mutações somáticas neste gene (Vousden & Lu, 2002; Vousden & Lane, 2007). Dependendo da mutação, pode haver perda de resposta mediada pela p53 ou ganho de funções. Esta última estaria relacionada com a capacidade de uma p53 mutante interagir com outros fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear Y (NF-Y) (Whibley *et al.*, 2009).

Clinicamente, os efeitos dos polimorfismos são mais discretos quando comparados com mutações de alta penetrância nas células primitivas (Whibley *et al.*, 2009). Acredita-se que alguns polimorfismos no gene *TP53* tenham correspondência com a função alterada da p53 em decorrência de modificações pós-traducionais, modificando a estabilidade da proteína ou afetando suas interações com outras proteínas (Menendez *et al.*, 2006). As características que sugerem um potencial fenotípico relacionado ao câncer podem resultar de polimorfismos observados nas sequências codificadoras do gene que modificam a sequência de aminoácidos da proteína, ou variantes com alterariam o nível de expressão alterado (Whibley *et al.*, 2009). Até o momento, existem mais de 200 polimorfismos já identificados em diferentes locais do gene *TP53* que, embora sejam considerados fenotipicamente silenciosos, poderiam afetar o risco de câncer, bem como a sua progressão e/ou resposta ao tratamento através do comprometimento das atividades da p53 na resposta de supressão tumoral (Whibley *et al.*, 2009).

Como previamente mencionado, a regulação e a ativação da p53 são mediadas principalmente por modificações covalentes pós-traducionais por meio de mecanismos de fosforilação, acetilação, ubiquitinação e metilação de sítios específicos da p53 (Kruse & Gu, 2008) e esta variedade de modificações permitem respostas variadas aos diferentes estímulos (Tang *et al.*, 2008; Ozeki *et al.*, 2011). Acredita-se que os polimorfismos localizados nestes sítios de ativação da p53 sujeitos a alterações diante de estresse celular poderiam influenciar a resposta da p53 (Whibley *et al.*, 2009).

Dentre os polimorfismos no gene *TP53* descritos até o momento, destaca-se o polimorfismo de base única (SNP) *TP53* g.11446C>G (rs1042522) (IARC – *TP53 database*, 2010), conhecido como o polimorfismo do códon 72 do éxon 4 inicialmente

caracterizado por Matlashewski e colaboradores (1987). Na proteína p53, a transversoão C para G no códon 72 corresponde a uma substituição de prolina (CCC) por arginina (CGC) na região da p53 denominada domínio rico em prolina. De forma a padronizar a sua designação, os alelos *TP53* 11446C e *TP53* 11446G serão representados por *p53* 72C (alelo Pro) e *p53* 72G (alelo Arg), respectivamente, e os genótipos correspondentes serão denominados *p53* 72CC (Pro/Pro), *p53* 72CG (Pro/Arg) e *p53* 72GG (Arg/Arg). Visto que esta região mostra-se importante na regulação da estabilidade e atividade da p53 (Toledo & Wahl, 2006), conforme citado anteriormente, o polimorfismo no éxon 4, g.11446C>G, poderia interferir na estabilidade da proteína p53 (Sun *et al.*, 1999).

A distribuição alélica nas populações já estudadas indica que a frequência do alelo *p53* 72G, também denominado na literatura como alelo *p53*Arg, aumenta proporcionalmente com a latitude, sendo este alelo predominante entre caucasianos, enquanto o alelo *p53* 72C (alelo *p53*Pro) exibe comportamento inverso, sendo mais frequente em populações negras (Beckman *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2009).

Estudos brasileiros envolvendo polimorfismo do códon 72 do éxon 4 no gene *TP53*, realizados em populações das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste observaram, no geral, frequências elevadas do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) (em torno de 40 a 50%) e frequências baixas do genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) (menor que 10%) (Drummond *et al.*, 2002; Cortezzi *et al.*, 2004; Smith MA *et al.*, 2007; Honma *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008, Thurow *et al.*, 2011). Entretanto, um estudo com população da região Centro-Oeste (Goiânia) demonstrou elevada frequência de indivíduos heterozigotos *p53* 72CG (Pro/Arg), com valores de até 68.9% (Silva *et al.*, 2009). Esses dados denotam a variação da distribuição genotípica correspondente a esse polimorfismo encontradas em nosso país.

Os trabalhos descritos na literatura sobre a possível correlação do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* com o câncer cervical apresentam resultados altamente conflitantes. O estudo de Storey e colaboradores (1998) foi pioneiro em mostrar que mulheres homozigotas *p53* 72GG (Arg/Arg) tinham risco aumentado em aproximadamente sete vezes, em comparação às heterozigotas, de desenvolver câncer do colo uterino. Além disso, os autores observaram que a variante *p53*Arg apresentava maior suscetibilidade à degradação induzida pela oncoproteína E6 do HPV do que a variante *p53*Pro.

A partir dessas evidências, Thomas e colaboradores (1999) realizaram o primeiro estudo em que foi possível evidenciar que as duas variantes da p53 (p53Arg e p53Pro) apresentam diferenças bioquímicas, funcionais e estruturais marcantes. Os autores observaram que apesar de não haver diferença entre as variantes p53Arg e p53Pro quanto à capacidade de se ligar ao DNA, existem diferenças quanto à atividade transcricional e à capacidade de induzir apoptose e de inibir a transformação celular. A variante p53Pro tem maior capacidade de induzir a transcrição do que a p53Arg. Já a variante p53Arg é mais eficiente em induzir a apoptose e em suprimir a transformação do que a p53Pro.

Desde então, inúmeros estudos semelhantes ao de Storey e colaboradores (1998) foram realizados para verificar a correlação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e o câncer cervical em diferentes populações. Entretanto, os resultados se mostram conflitantes, de maneira que a associação do genótipo p53 72GG (Arg/Arg) com o risco de desenvolvimento de câncer cervical ainda não está totalmente esclarecida.

Alguns grupos descreveram uma correlação entre o genótipo p53 72GG (Arg/Arg) e o câncer cervical (Zehbe *et al.*, 1999; Agorastos *et al.*, 2000; Makni *et al.*, 2000; Arbel-Alon *et al.*, 2002; Pegoraro *et al.*, 2002; Ojeda *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2010), porém com valores de risco menores do que o relatado por Storey e colaboradores (1998). No entanto, na maioria dos estudos não se observou qualquer associação entre o polimorfismo do códon 72 do éxon 4 do gene *TP53* e a predisposição a desenvolver lesões pré-malignas ou malignas do colo uterino (Helland *et al.*, 1998; Hayes *et al.*, 1998; Tenti *et al.*, 2000; Giannoudis *et al.*, 1999; Tachezy *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Klug *et al.*, 2001; Humbey *et al.*, 2002; Araujo Souza & Villa, 2003; Abba *et al.*, 2003; Comar *et al.*, 2004; Koushik *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Anschau *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; El khair *et al.*, 2010; Nunobiki *et al.*, 2011).

Diferentemente dos trabalhos acima mencionados, foi observada associação entre câncer de colo uterino, presença de HPV16/18 e o genótipo p53 72CC (Pro/Pro) em mulheres da Índia, Costa Rica e China (Bhattacharya *et al.*, 2002; Bhattacharya & Sengupta, 2005; Koshiol *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010). Também foi relatada a associação entre o genótipo heterozigoto p53 72CG (Pro/Arg) e a suscetibilidade aumentada para desenvolver câncer de colo uterino em mulheres da Coréia, Peru e Argentina (Kim *et al.*, 2000; Klug *et al.*, 2001; Barbisan *et al.*, 2011).

Na população brasileira, estudos realizados nas regiões Sul e Sudeste não demonstraram associação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* com neoplasia cervical (Brenna *et al.*, 2004; Anschau *et al.*, 2005). Em outros dois estudos brasileiros, realizados em Natal e no Rio de Janeiro, observou-se maior frequência do genótipo heterozigoto *p53* 72CG (Pro/Arg) entre mulheres com HSIL e/ou câncer cervical, sendo apontado como possível fator de risco para desenvolvimento de neoplasias cervicais (Fernandes *et al.*, 2008; Ferreira da Silva *et al.*, 2010).

Considerando a grande divergência de resultados observada nos vários trabalhos, já foram realizados quatro estudos de meta-análise e, no geral, não foi observada associação entre polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e o câncer cervical (Jee *et al.*, 2004; Koushik *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007; Klug *et al.*, 2009). No entanto, os autores concordam que a heterogeneidade observada nos estudos associada a erros metodológicos e viés em relação à etnia poderiam influenciar a interpretação dos dados.

A discrepância observada entre as distribuições genotípicas nas populações estudadas aliada ao fato do genoma do HPV possuir variações entre as diferentes regiões geográficas (Yamada *et al.*, 1997) e a grande heterogeneidade dos critérios metodológicos empregados nos estudos, corrobora a necessidade de outros trabalhos com metodologia rigorosa e de preferência com amostras significativas, envolvendo a associação do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e de outros fatores de risco com o câncer cervical (Souza *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2011).

Outro polimorfismo do gene *TP53* comumente estudado se localiza em região não codificadora. O polimorfismo g.11259_11274del16 (rs 17878362) (IARC – *TP53 database*, acessado em junho de 2012) se localiza no íntron 3, sendo denominado na literatura como *p53* PIN3 e tendo sido originalmente descrita como uma inserção de 16 nucleotídeos (Lazar *et al.*, 1993), e posteriormente melhor caracterizada por uma duplicação de 16 nucleotídeos. Os alelos correspondentes serão designados por *p53* PIN3 A1 (sem duplicação) e *p53* PIN3 A2 (com duplicação).

Este é o único polimorfismo intrônico que tem sido associado com aumento do risco de alguns tipos de câncer, tais como de ovário, mama, pulmão e colo-retal (Wang-Gohrke *et al.*, 2002; Gemignani *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008; Boldrini *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010). São poucos os estudos correlacionando o polimorfismo do

íntron 3 com o câncer cervical e, em todos eles, este polimorfismo foi estudado em associação com outros polimorfismos do gene *TP53* ou de outros genes. Kim e colaboradores (2000) não observaram correlação entre este polimorfismo e o câncer cervical, seja isoladamente ou em associação com outros polimorfismos dos genes *TP53*, *GST* e *CYP*. Outro estudo correlacionando três polimorfismos (íntron 3, códon 72 e íntron 6) no gene *TP53* com câncer cervical em mulheres da Índia revelou risco aumentado de 2,59 para esta neoplasia no grupo de pacientes homozigotas *p53* 72GG (Arg/Arg). Não houve diferença em relação aos polimorfismos intrônicos, porém a associação do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) se manteve forte quando relacionada com o genótipo *p53* PIN3 A1 (ausência de duplicação de 16 pares de bases) (Mitra *et al.*, 2005).

Estudo semelhante em mulheres brasileiras, em que se avaliou três polimorfismos do gene *TP53* (íntron 2, íntron 3 e éxon 4), não se observou associação entre polimorfismo do íntron 3 do gene *TP53* com o desenvolvimento de câncer do colo uterino (Fernandes *et al.*, 2008).

1.7 Polimorfismos no gene *p21(WAF1)* e as neoplasias cervicais

O gene *p21*^{*WAF1, CIP1, CDKN1A*} (OMIM *116899) está localizado no braço curto do cromossomo 6, na região 21.2, e consiste de três éxons de 65, 450 e 1589 pares de bases (el-Deiry *et al.*, 1993) (Figura 8).

Visto que o gene *p21* tem grande importância na regulação do ciclo celular e alterações em sua expressão foram observadas em várias neoplasias malignas, incluindo as de mama, pulmão, ovário, próstata, esôfago, fígado, colorretal e colo uterino, entre outras (Ma *et al.*, 2011), supõe-se que o gene *p21* esteja envolvido no processo de carcinogênese. Entretanto, mutações na região codificadora do gene *p21*, com conseqüente alteração da função da proteína *p21*, são raras (Shiohara *et al.*, 1994). Desse modo, muitos estudos têm focado nas variantes genéticas de *p21* e alguns polimorfismos funcionais têm sido identificados como fator de risco em diferentes tipos de câncer (Ma *et al.*, 2011).

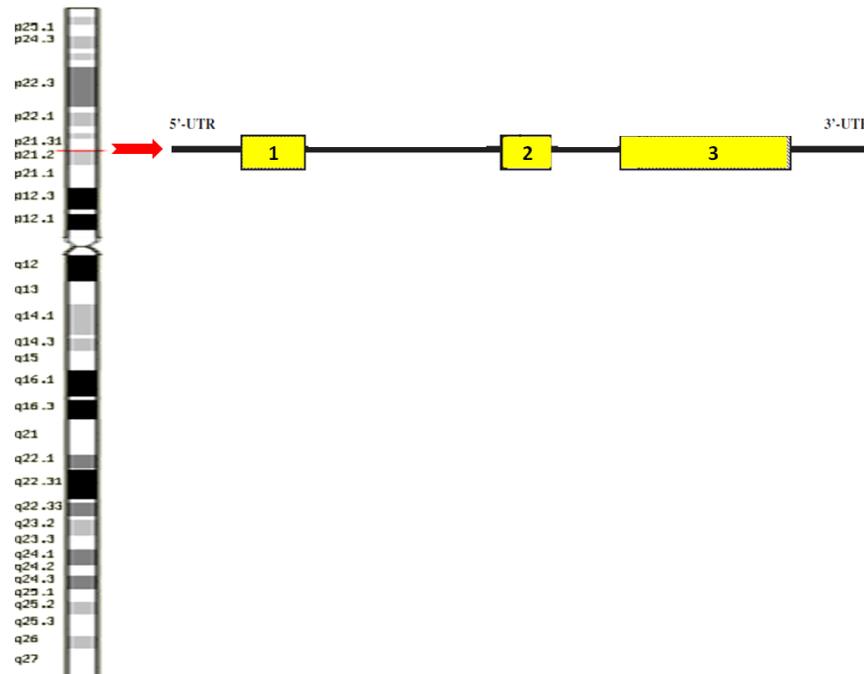


Figura 8: Cromossomo 6 e o gene *p21*: Esquema evidenciando as subregiões do cromossomo 6, a localização do gene *p21* e o gene *p21*, com três exons. (Modificado de GeneCards® - The Human Gene Compendium: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*p21*, *Cip1*), 2009 e Li *et al.*, 2005).

O polimorfismo mais frequentemente investigado do gene *p21* é o SNP g.10513C>A (rs1801270), comumente denominado na literatura como polimorfismo do códon 31 do gene *p21*. Os dois alelos *p21* 10513C (Ser) e o *p21* 10513A (Arg) serão identificados como *p21* 31C e *p21* 31A, respectivamente e os genótipos correspondentes serão designados por *p21* 31CC (Ser/Ser), *p21* 31CA (ser/Arg) e *p21* 31AA (Arg/Arg). A transversão C para A resulta na substituição de serina (códon AGC) por arginina (códon AGA) em uma região conservada da proteína *p21* (Chedid *et al.*, 1994). Em alguns estudos foi sugerido que as variantes alélicas *p21* 31C e *p21* 31A apresentam atividade inibidora de quinase e capacidade de inibição do crescimento semelhantes, embora os autores tenham demonstrado diferença significativa na eficiência de transcrição das variantes e observado que indivíduos portadores do alelo *p21* 31A (Arg) apresentam menor expressão de *p21* (Johnson *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011).

Um fato interessante é que as frequências das variantes polimórficas desse gene diferem entre os diversos grupos étnicos já estudados, notando-se baixa prevalência (4%) do genótipo *p21* 31AA (Arg/Arg) em caucasianos, intermediária (29%) nos negros africanos e elevada (47%) nos chineses (Birgander *et al.*, 1996;

Gravina *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). Estudos brasileiros mostraram baixa prevalência do genótipo *p21* 31AA (Arg/Arg), com valores semelhantes àqueles observados em populações caucasianas (Gomes *et al.*, 2008; Valentin *et al.*, 2009).

Na população coreana, o genótipo *p21* 31CC (Ser/Ser) representou risco para o desenvolvimento de câncer cervical (CCE e adenocarcinoma) (Lee JE *et al.*, 2004), ou somente em relação ao tipo adenocarcinoma associado ao HPV de alto risco (16 ou 18) (Roh *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2010). Contrariamente, em outro trabalho, o genótipo *p21* 31AA (Arg/Arg) representou risco para o desenvolvimento de câncer de colo uterino quando associado a polimorfismos dos genes *GSTM1* (glutathione-S-transferase) e *TP53* (Lee SA *et al.*, 2004). Outros estudos também observaram associação entre o alelo *p21* 31A (Arg), em homozigose ou heterozigose, e o carcinoma escamoso do colo uterino em mulheres japonesas e chinesas, independentemente do *status* do HPV (Harima *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2009).

Em estudo realizado em população indiana, com o objetivo de identificar a possibilidade de associação entre câncer cervical e variantes polimórficas dos genes *TP53* (códon 72) e *p21* (códon 31), independentemente ou em conjunto, não foi observado qualquer efeito significativo (aditivo ou multiplicativo) entre os alelos *p53* 72C (Pro) e *p21* 31A (Arg) em mediar a carcinogênese cervical (Bhattacharya & Sengupta, 2005). Porém, quando avaliados de modo independente, o genótipo homozigoto *p53* 72CC (Pro/Pro) conferiu risco para câncer cervical nas pacientes HPV 16/18 positivas enquanto que o alelo raro *p21* 31A (Arg) também foi identificado como fator de risco para câncer cervical independente do *status* do HPV. Em um estudo semelhante envolvendo a população chinesa, foram obtidos resultados divergentes do acima referido, tendo sido demonstrado aumento do risco de câncer cervical em mulheres homozigotas *p53* 72GG (Arg/Arg) (risco = 2,25) ou *p21* 31CC (Ser/Ser) (risco = 2,09) e quando associados, o risco aumentou para 3,96 (Jiang *et al.*, 2010).

Dois estudos de meta-análise recentes sobre a associação entre o polimorfismo do códon 31 do gene *p21* e vários tipos de neoplasias malignas, concluíram que o genótipo *p21* 31AA (Arg/Arg) confere aumento de risco principalmente para as neoplasias de mama e colorretal em população caucasiana (Ma *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Esses estudos sugerem que este polimorfismo não aumenta o risco de desenvolvimento de câncer cervical.

Em geral, os estudos da importância de polimorfismos no desenvolvimento das neoplasias cervicais recaem principalmente na análise dos polimorfismos nos genes *TP53* (códon 72) e *p21* (códon 31), porém com resultados controversos. Em relação ao polimorfismo do íntron 3 do gene *TP53*, poucos trabalhos descritos na literatura correlacionam este polimorfismo com as neoplasias do colo uterino. Na população brasileira, estudos de associação entre esses polimorfismos e o desenvolvimento de câncer de colo uterino são escassos. Além disso, é importante destacar que a carcinogênese cervical está associada à infecção pelo HPV, cujas oncoproteínas virais E6 e E7 atuam direta e indiretamente nos produtos desses dois genes, e somente um grupo pequeno de mulheres infectadas evolui para lesões de alto grau. Portanto, é fundamental ampliar o conhecimento dos aspectos genéticos que poderiam contribuir neste processo de progressão da doença e definir o impacto desses polimorfismos sobre a expressão da proteína no tecido com lesão, o que pode ter valor diagnóstico e/ou prognóstico e até mesmo determinar condutas clínicas mais individualizadas. Deve-se ressaltar também que embora polimorfismos únicos possam não ter qualquer implicação com o desenvolvimento de um determinado tipo de tumor, interações gene-gene e gene-ambiente podem ser de grande relevância.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se os polimorfismos do íntron 3 e do códon 72 do gene *TP53* e do códon 31 do gene *p21^{WAF1}* representam fatores de risco ou modificadores de risco de desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais em mulheres residentes no Rio de Janeiro. Um segundo objetivo consistiu em avaliar os padrões de expressão das proteínas p53, p21, p16 e ciclina D1 e o *status* em relação à infecção por HPV nos diferentes tipos de lesão cervical, visando estabelecer possíveis correlações dos genótipos referentes aos polimorfismos dos genes *TP53* e *p21^{WAF1}* com os níveis de expressão desses genes e/ou status da infecção por HPV, e um perfil de expressão das moléculas analisadas capaz de diferenciar os graus de severidade das lesões cervicais.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar as distribuições genótípicas e alélicas correspondentes aos polimorfismos dos genes *TP53* (*p53* PIN3 e *p53* 72C>G) e *p21^{WAF1}* (*p21* 31 C>A) entre os grupos controle (mulheres sem história atual e pregressa de neoplasia cervical) e de casos (pacientes com neoplasias de colo uterino), entre o grupo controle e os subgrupos de casos (LSIL e HSIL+câncer) e entre os dois subgrupos de casos.
- Realizar a análise de interação multiplicativa dos polimorfismos com fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de neoplasias cervicais
- Realizar a análise multiplicativa de genótipos e alelos correspondentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A e avaliar a sua importância para o desenvolvimento e/ou severidade das lesões cervicais.

- Avaliar o perfil de expressão imunohistoquímica das proteínas p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67, e a positividade imunohistoquímica para HPV-16 e HPV pool, pela técnica de **Tissue Microarray**, em amostras de tecido cervical do grupo de casos, classificadas histologicamente como LSIL, HSIL e carcinoma invasor.

- Correlacionar os genótipos referentes aos polimorfismos dos genes *TP53* e *p21* com os níveis de expressão desses genes e o *status* da infecção por HPV nos subgrupos de casos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Estudo transversal prospectivo do tipo caso-controle de uma amostra composta por 466 mulheres não aparentadas residentes na cidade do Rio de Janeiro, divididas em grupo controle (mulheres sem história atual ou pregressa de alterações citológicas da cérvix uterina) e grupo de casos (mulheres portadoras de neoplasias de colo uterino).

O grupo de casos foi composto por mulheres encaminhadas ao ambulatório de Patologia Cervical do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/ FIOCRUZ) por terem apresentado exame preventivo de citologia alterado, com a finalidade de realizar exame de colposcopia e eventual biópsia ou outras intervenções cirúrgicas, de acordo com a indicação clínica. As pacientes foram incluídas neste estudo de modo sequencial no período de março de 2009 a março de 2010. Os critérios de inclusão considerados foram: mulheres com citologia e/ou biópsia prévia exibindo lesões pré-malignas ou malignas do colo uterino associado a exame colposcópico satisfatório e com lesões. Pacientes com citologia alterada, porém com colposcopia insatisfatória, sem lesões e sem biópsia não foram incluídas no estudo. Os critérios de exclusão considerados foram: mulheres em uso de imunossupressores, portadoras de qualquer tipo de doença autoimune, portadoras de HIV ou câncer, pacientes submetidas à histerectomia total, mulheres virgens e mulheres que não toleraram a realização do exame ginecológico. De acordo com esses critérios, foi formado um subgrupo de pacientes que estavam sendo atendidas pela primeira vez no ambulatório de Patologia Cervical e que poderiam ser biopsiadas ou seriam submetidas à retirada da lesão com caráter terapêutico. Um segundo subgrupo incluiu as pacientes que estavam em acompanhamento por terem apresentado previamente laudo histopatológico com qualquer tipo de lesão neoplásica do colo uterino. De todas as pacientes pertencentes ao grupo de casos foram coletadas amostras de sangue periférico, visando à análise molecular de polimorfismos genéticos, células cervicais, visando à detecção de DNA de HPV e determinação do tipo viral, e material representativo da lesão do colo uterino para estudo histopatológico e imunohistoquímico.

O grupo controle foi selecionado em etapa anterior a este trabalho e foi formado por 185 mulheres com idade média de $36,9 \pm 10,1$ anos e faixa etária entre 17 e 66 anos que procuraram espontaneamente atendimento no ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), ou na Unidade de Saúde da Policlínica Piquet Carneiro (PPC/UERJ), com objetivo único de realização, em regime de rotina, do exame preventivo para o câncer de colo uterino, e cujos resultados da citologia foram negativos para evidências de ASCUS, AGUS, LSIL, HSIL ou câncer. Os critérios de exclusão considerados foram os mesmos que para o grupo de casos. Das pacientes incluídas neste grupo foram utilizadas amostras de DNA genômico extraído de sangue periférico, visando à análise molecular dos polimorfismos genéticos de interesse. As amostras de DNA extraído a partir do material cervical fizeram parte do estudo intitulado “Análise da prevalência das displasias cervicais e da infecção pelo papilomavírus humano em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico”, que constituiu o tema de tese de doutorado do Dr. Evandro Klumb. A construção desses dois bancos de DNA foi realizada em uma etapa anterior a este trabalho por integrantes do nosso grupo de pesquisa e sob a supervisão da responsável técnica Amanda Chaves Pinto.

Todas as integrantes deste estudo responderam a um questionário padronizado (**Apêndice A**) para alguns dos aspectos demográficos e específicos de comportamento sexual considerados como fatores de risco para câncer de colo uterino e infecção pelo HPV.

3.2 Considerações éticas

Os projetos envolvendo a seleção dos grupos de casos e controles foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IFF/FIOCRUZ, sob o nº 0037/08 (**Anexo A**), e do HUPE/UERJ sob os nºs. 321 e 909 (**Anexo B**), respectivamente. Todas as amostras foram obtidas a partir da autorização formal das pacientes mediante a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndices B e C**).

3.3 Coleta de material biológico – grupo de casos

3.3.1 Sangue periférico

Foram coletados cerca de 5 mL de sangue periférico de cada indivíduo. Esta coleta foi realizada por enfermeiras e/ou equipe médica, utilizando tubos vacutainer® com anticoagulante EDTA. Este material foi transportado até o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Biologia da UERJ, visando à extração de DNA conforme descrito no item 3.6.1.

3.3.2 Material para estudo histopatológico

As pacientes atendidas pela primeira vez no ambulatório de Patologia Cervical do IFF/FIOCRUZ, foram submetidas a exame de colposcopia e, de acordo com a indicação clínica individualizada, foi realizada biópsia da lesão ou exérese da zona de transformação em regime ambulatorial com anestesia local. Em alguns casos específicos, a retirada da lesão foi realizada no centro cirúrgico sob anestesia geral. Todos os espécimes obtidos foram imersos em solução de formol tamponado a 10% e clivados de acordo com as normas estabelecidas e processados em aparelho de autotécnico. Após a confecção dos blocos de parafina, estes foram cortados com cerca de 5 µm de espessura, montados em lâminas e corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE), visando à análise histopatológica.

As pacientes em acompanhamento médico e com laudo histopatológico prévio de neoplasia cervical, seja em material de biópsia ou fragmentos de colo uterino, tiveram seus materiais (lâminas e blocos de parafina) recuperados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do IFF/FIOCRUZ.

3.4 Estudo histopatológico

A leitura das lâminas dos casos novos foi realizada por dois patologistas experientes (Elyzabeth Avvad Portari e Dione Correa de Araújo Dock) e as lesões cervicais foram classificadas de acordo com o Sistema Bethesda 2001 (Solomon *et al.*, 2002) em subgrupos de pacientes com lesão escamosa intraepitelial cervical de baixo grau – LSIL, que corresponde ao efeito citopático causado pelo HPV e à neoplasia intraepitelial cervical grau 1-NIC I, lesão escamosa intraepitelial cervical de alto grau – HSIL, correspondendo às neoplasias intraepiteliais cervicais grau 2 e 3 - NIC II e NIC III, e câncer. Das integrantes do grupo de casos foi possível resgatar 196 casos para a análise histológica.

3.5 Análise Imunohistoquímica

Considerando o número de casos (196) avaliados e a quantidade de reações de imunohistoquímica (sete), optou-se por realizar o estudo imunohistoquímico através da técnica alternativa de produção de *Tissue Microarray* (TMA) descrita por Pires e colaboradores (2006). A construção dos blocos de TMA e a técnica de imunohistoquímica foram realizadas no Laboratório Fonte Medicina Diagnóstica, em Niterói.

3.5.1 Técnica do *Tissue Microarray* (TMA) alternativo

Esta técnica é baseada na construção de “agulhas de TMA”, por meio da modificação de agulhas hipodérmicas convencionais Becton-Dickinson PrecisionGlide®, utilizando uma microrretífica Dremel Multi-Pro® Rotary Tool Model 395, em baixa rotação (<10.000 rpm), da seguinte forma: corte da ponta em bixel, abertura de janela lateral distando 1 mm da nova ponta e afiamento externo e interno da ponta redonda para que esta possa cortar, sem danos, o bloco de parafina. Os cilindros de tecido foram obtidos por punção da agulha adaptada a uma máquina de

colocação de ilhós; este procedimento “semi-automatizado” visa garantir punção vertical rápida e segura, superior ao procedimento manual.

As lâminas correspondentes aos 196 casos foram revistas pelo patologista, que selecionou as áreas de interesse, lesão e mucosa normal (quando possível), para punção de cada caso, circulando as mesmas com caneta de marcação (cerca de 1 a 2 mm de diâmetro). Foram puncionados dois a quatro cilindros de tecido de cada caso utilizando agulha com 1,1 mm de diâmetro. Os cilindros de tecido dos blocos doadores correspondentes aos casos foram transferidos para um molde de inclusão de aço inoxidável. Este foi previamente preparado com uma grade, produzida no programa de desenho *CorelDraw*[®] (versão 14) e impressa em papel comum, contendo círculos brancos com 1 mm de diâmetro e espaçamento de 0,5 mm e coberta por fita adesiva dupla face. Uma vez que todos os cilindros estavam aderidos à grade no molde, de forma alinhada e perpendicular, seguindo um mapa de orientação da localização de cada tecido no bloco, o molde foi preenchido por parafina líquida. Foram incluídos, além dos cilindros de tecido dos casos em estudo, cilindros de tecido utilizados como controles positivos e controles negativos das reações imunohistoquímicas, que serviram também para a orientação espacial do TMA. Ao todo foram construídos cinco blocos de TMA, três deles contendo fragmentos de colo uterino com diferentes tipos de lesão e dois blocos contendo fragmentos de colo uterino retirados de área normal adjacente ou próxima à lesão. Em seguida, foram realizados vários cortes e foram confeccionadas dez lâminas de cada bloco, com espessura de 4 µm. A primeira e a décima lâminas foram coradas por HE e avaliadas pelo patologista para garantir a presença da representatividade da lesão nas demais lâminas (segunda à nona) a serem utilizadas para a técnica de imunohistoquímica.

3.5.2 Técnica de Imunohistoquímica

A marcação imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos de blocos de TMA de 4 µm de espessura, dispostos em lâminas eletricamente positivas (silanizadas). Os cortes foram desparafinizados em estufa a 60°C (± 5°C)

por cerca de 40 a 50 minutos. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em quatro banhos de ECO-K / EasyClean Solvente ecológico (GW EasyPath) por 5 minutos, dois banhos de etanol absoluto (Allkimia) por 5 minutos, e dois banhos de etanol (Allkimia) a 95% por 5 minutos e lavadas com água destilada. A seguir, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (30 volumes) (B-Herzog) diluído em 250 mL de metanol a 30% (Allkimia) por 15 minutos e, então, foi feita a lavagem com água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão Trilogy (Cell-Marque, diluição 1:400), em banho-maria a 96°C por 40 minutos. Ao final, as lâminas foram resfriadas em água corrente por 20 minutos e lavadas com tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline* – solução salina tamponada).

Enquanto as lâminas estavam na fase anterior de recuperação antigênica, os anticorpos específicos foram diluídos com solução diluidora comercial (Biocare DaVinci Green): anti-p53 (anticorpo monoclonal de camundongo, clone DO-7, DAKOCytomation, diluição 1/80), anti-p21-WAF 1 (anticorpo monoclonal de camundongo, clone 4D10, Novocastra Lab; diluição 1/50); anti-p16 (anticorpo monoclonal de camundongo liofilizado, clone 6H12, Novocastra Lab, diluição 1/150); anti-ciclina D1 (anticorpo monoclonal de coelho, EPR 2241 ICH-32, Cell-Marque Corporation, diluição 1/200); anti-Ki-67 (anticorpo monoclonal de coelho, clone SP6, Cell-Marque Corporation, diluição 1/500); anti-HPV *pool* contra HPV 1, 6, 11, 16, 18 e 31 (anticorpo monoclonal de rato prediluído, clone BPV-1/148+CAMVIR, Biocare Medical, diluição 1/160) e anti-HPV 16 (anticorpo monoclonal de rato, clone CAM VIR-1, Biocare Medical, diluição 1:100).

Para bloqueio de ligações inespecíficas, as lâminas foram colocadas em banho com solução bloqueadora (peróxido de hidrogênio a 3%) por 15 minutos. Então, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários acima mencionados, na diluição pré-estabelecida, por uma hora, e cada lâmina foi identificada. Após eliminação do excesso de anticorpo com tampão PBS, as lâminas foram incubadas com o primeiro polímero do sistema de visualização MACH4 Universal HRP (Biocare Medical), o reagente da ligação, por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em tampão PBS e incubadas com o segundo polímero MACH4 Universal HRP (Biocare Medical), o reagente de marcação, por 30 minutos. Após lavagem com tampão PBS, as reações foram reveladas com DAB (5-diaminobenzidina, Sigma-Aldrich Co.), por 5 minutos, depois lavadas em água

destilada e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos. O excesso foi retirado em água corrente, as lâminas foram imersas rapidamente em água amoniacal e a seguir desidratadas, clareadas e montadas em meio sintético *Entellan* (MERCK). Os controles positivos foram representados por amostras de mucosa cervical contendo lesão de alto grau ou carcinoma escamoso, previamente testadas para todos os anticorpos em ensaios anteriores.

Os critérios avaliados no estudo imunohistoquímico foram: A) Positividade ou Negatividade da reação para os diversos anticorpos, sendo a positividade representada pela presença de coloração acastanhada bem definida. Os casos de positividade menor que 10% restrita às camadas basal e parabasal para os anticorpos anti-p53, anti-p21, anti-ciclina D1 e anti-Ki-67 foram considerados negativos. B) Localização da positividade na célula: nuclear, quando restrita ao núcleo (N); citoplasmática (C), quando localizada no citoplasma; nuclear / citoplasmática, nos casos em que foi observada positividade nuclear e citoplasmática (N/C). C) Altura da positividade em relação à espessura do epitélio, considerada somente nos casos de neoplasias intraepiteliais, foi graduada em 1, positividade apenas no terço inferior da mucosa escamosa; 2, presença de positividade comprometendo dois terços da espessura da mucosa; 3, positividade atingindo o terço superior ou em toda a espessura do epitélio escamoso estratificado. D) Intensidade da positividade que foi considerada 1, leve ou fraca; 2, moderada e 3, forte ou intensa. A avaliação imunohistoquímica para os anticorpos anti-HPV 16 e anti-HPV *pool* foi considerada positiva ou negativa, independente da quantidade de células positivas. Todos os dados foram computados separadamente para cada cilindro e tabulados em planilha Excel. Quando havia discordância entre os mesmos, os casos foram revistos e discutidos por dois patologistas, que consideraram os maiores valores acordado entre eles.

3.6 Construção dos bancos de DNAs genômicos – grupo de casos

A construção dos bancos de DNAs a partir de amostras de sangue periférico e de material cervical das integrantes do grupo de casos foi realizada pela aluna de mestrado Sandra Liliana Vargas Torres e pela bióloga Amanda Chaves Pinto.

3.6.1 Extração de DNA a partir de amostras de sangue periférico

O DNA genômico foi obtido a partir de sangue periférico utilizando-se o protocolo descrito por Lahiri & Schnabel (1993). Resumidamente, o sangue coletado em EDTA, conforme descrito no item 3.3.1, foi centrifugado por 10 minutos, a 2.500 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados ao sedimento 3,0 mL de tampão TKM (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, INVITROGEN; 10 mM KCl, MERCK; 4 mM MgCl₂, MERCK; 2 mM EDTA pH 8,0, MERCK) e 75 µL de Triton X-100 (USB) e a mistura foi homogeneizada por inversão do tubo. Após centrifugação por 10 minutos a 2.500 rpm (microcentrífuga EPPENDORF – MODELO 5415C) e à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado em frasco apropriado para material orgânico. O sedimento contendo leucócitos foi lavado duas vezes sucessivas pela adição de 3 mL de tampão TKM seguida de centrifugação por 10 minutos, a 2.500 rpm e à temperatura ambiente, e descarte do sobrenadante. Foi feita, então, a adição de 600 µL de tampão TKM e 45 µL de SDS a 10% (MERCK) e a mistura foi incubada a 55°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados à mistura 225 µL de NaCl saturado e após cuidadosa homogeneização, procedeu-se novamente a centrifugação por 5 minutos, a 12.000 rpm, e à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo de vidro com 2 mL de etanol absoluto (MERCK). Após a precipitação, o DNA foi retirado do tubo cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur e lavado em etanol a 70% para retirada do excesso de sal. O DNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em 300 µL de tampão TE 1X e incubado por 30 minutos a 65°C para inativação da DNase. A solução de DNA foi incubada por 16 horas a 37°C e, então, foi dividida em duas alíquotas, uma mantida a 4°C e outra estocada a – 20°C.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*)

A técnica de PCR foi empregada na amplificação das regiões de interesse dos genes *TP53* (íntron 3 e o éxon 4) – p5334-PCR e *p21^{WAF-1}* (códon 31) – p2131-PCR. Os oligonucleotídeos usados na p5334-PCR foram desenhados de acordo com as sequências obtidas do NCBI-GENBANK GI:3041866 (gene *TP53*) e para p2131-PCR, foi utilizado par de oligonucleotídeos desenhado por Konishi e colaboradores (2000), cuja sequência foi verificada por nosso grupo de estudo em acordo com aquela obtida no NCBI-GENBANK GI:221139857 (gene *p21^{WAF-1}*). Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela RW genes. As sequências correspondentes aos oligonucleotídeos utilizados em cada reação de amplificação, assim como os genes alvos para cada par de oligonucleotídeos e os tamanhos dos *amplicons* gerados estão listados no Quadro 1 e as condições de ciclagem empregadas estão especificadas no Quadro 2. Os componentes das misturas reacionais estão descritos nos itens 3.7.1 (p5334-PCR) e 3.8.1 (p2131-PCR). As amostras de DNA usadas como molde eram pertencentes aos bancos de DNAs extraídos de amostras de sangue periférico das integrantes dos grupos de casos e controles.

Para cada conjunto de reações foi preparado um controle negativo, com todos os constituintes da reação exceto o DNA molde, e um controle positivo, correspondente ao DNA molde de amostras cujos genótipos eram conhecidos.

Quadro 1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação das regiões genômicas de interesse. Suas sequências, genes alvos e tamanhos dos *amplicons* resultantes.

PCR	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene Alvo	Amplicon (pb)
p5334	p5334F	GAGACCTGTGGGAAGCGAA	<i>TP53</i>	476 ou 492
	p5334R	GGAAGCCAGCCCCTCAG	<i>TP53</i>	
p2131	p2131F	TGTATCTCTGCTGCAGGCG	<i>p21</i>	179
	p2131R	AAGTCGAAGTCCATCGCTC	<i>p21</i>	

Quadro 2: Condições de ciclagem das três reações de amplificação: p5334-PCR e p2131-PCR.

Etapa	p5334-PCR	p2131-PCR
Prédesnaturação	94°C/5'	95°C/5'
Desnaturação	94°C/45''	95°C/30''
Pareamento	61°C/45''	61°C/30''
Extensão	72°C/45''	72°C/30''
Extensão Adicional	72°C/10'	72°C/10'
* Nº de ciclos	32	40

*Número de ciclos para as etapas de desnaturação, pareamento e extensão.

3.8 Análise dos polimorfismos do íntron 3 e do códon 72 do gene *TP53*

3.8.1 Amplificação de região que engloba os polimorfismos do íntron 3 (11259_11274del16) e do éxon 4 (11446C>G) do gene *TP53* – p5334-PCR

A região de interesse do gene *TP53*, que engloba os polimorfismos do íntron 3, g.11259_11274del16 (rs 17878362), e do códon 72 no éxon 4, g.11446C>G (rs 1042522), foi amplificada por PCR (p5334-PCR) empregando-se o par de oligonucleotídeos, p5334F e p5334R, listado no Quadro 1. A mistura reacional de 30 µL foi composta por tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM – INVITROGEN), MgCl₂ 1 mM (INVITROGEN), 40 µM da mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - PHARMACIA), 0,3 µM de cada oligonucleotídeo (p5334F e p5334R), 0,75 U de Platinum® Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 0,5 µL de DNA genômico e água deionizada estéril para completar o volume final. Os tubos contendo a mistura reacional foram colocados no termociclador (BioCycler - modelo MJ967), e submetidos a uma sequência de eventos especificada no Quadro 2.

A confirmação da eficiência da reação foi feita por análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida a 6% (item 3.10), o que permitiu também caracterizar genotipicamente as amostras em relação ao polimorfismo p53PIN3, conforme descrito no item 3.8.2.

3.8.2 Análise do polimorfismo do íntron 3 (g.11259_11274del16) do gene *TP53*

Para identificação dos genótipos correspondentes ao polimorfismo do íntron 3 do gene *TP53*, caracterizado pela duplicação de 16 pb, os produtos da p5334-PCR (item 3.8.1) foram submetidos à análise eletroforética em gel de poliacrilamida a 6% (item 3.10) com tempo de 2 horas, a 100V. O alelo A1 não apresenta a duplicação de 16 pb (amplicon de 476 pb), enquanto o alelo A2 contém a duplicação de 16 pb (amplicon de 492 pb). Portanto, os três possíveis genótipos são: homozigoto A1.A1, quando não há duplicação em nenhum dos dois alelos (um único fragmento de 476 pb); heterozigoto A1.A2, quando um dos alelos apresenta duplicação de 16pb e o outro não (dois fragmentos de 492 e 476 pb), e homozigoto A2.A2, os dois alelos apresentam duplicação de 16 pb (um único fragmento de 492 pb). Na figura 9, é apresentado um esquema representativo da análise molecular do polimorfismo do íntron 3 do gene *TP53*.

Aproximadamente 10 % das amostras foram reanalisadas e dois pesquisadores participaram da identificação dos genótipos, que foram confirmados por sequenciamento (item 3.12).

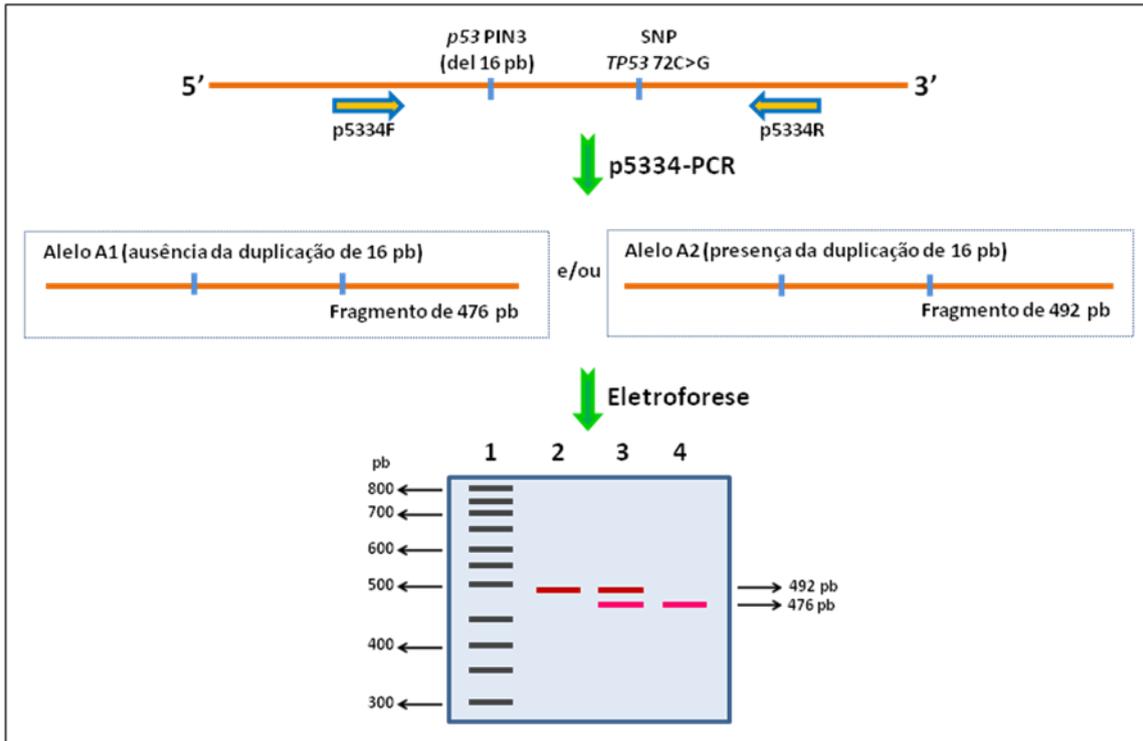


Figura 9: Esquema representativo da análise molecular do polimorfismo do íntron 3 do gene *TP53*. Representação da amplificação dos dois alelos por PCR e os padrões eletroforéticos dos três possíveis genótipos. Linha 1: Padrão de peso molecular de 50pb; linha2: produto de PCR relativo a um indivíduo homocigoto A2.A2 (um fragmento de 492 pb); linha 3: produto de PCR relativo a um indivíduo heterocigoto A1.A2 (dois fragmentos de 476 pb e 492 pb); linha 4: produto de PCR relativo a um indivíduo homocigoto A1.A1 (um fragmento de 476 pb).

3.8.3 Análise do polimorfismo do códon 72 (11446C>G) do gene *TP53*

O polimorfismo do éxon 4 do gene *TP53* é caracterizado por uma transversão C>G que resulta no ganho do sítio de reconhecimento da enzima *Bst*UI. O estudo desse polimorfismo foi realizado por PCR-RFLP (PCR associado ao polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição), que consistiu em digestão dos amplicons da p5334-PCR, com 476 pb ou 496 pb (item 3.8.1), dependendo, respectivamente, da ausência ou presença da duplicação de 16 pb com a enzima de restrição *Bst*UI, a qual reconhece e cliva a sequência de nucleotídeos CGCG, presente apenas no alelo *TP53* 72G (Arg).

A mistura reacional da digestão foi composta por 1,2 µL de tampão 10X da enzima correspondente (Tampão NEB2, New England Biolabs), 2 U da enzima *Bst*UI (New England Biolabs), 7,0 µL do produto de PCR e água deionizada estéril

para completar o volume final de 12 μ L. Essa mistura foi incubada por cerca de 16 horas a 60°C. Para cada conjunto de reações foram feitos os controles positivos e negativos constituídos por uma amostra de DNA com perfil de digestão conhecido e água em vez de enzima, respectivamente. Os produtos da digestão foram, então, analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (item 3.11) e os genótipos dos indivíduos classificados de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados. Os três possíveis genótipos apresentaram os seguintes perfis eletroforéticos: homozigoto *TP53* 72CC, um único fragmento de 476 pb ou 492 pb (dois alelos com a sequência CCCC não reconhecida pela enzima *Bst*UI), heterozigoto *TP53* 72CG, três fragmentos de 476 ou 492 pb, 289 ou 305 pb e 187 pb (um alelo sem sítio de reconhecimento da enzima e um alelo com a sequência CGCG reconhecida pela enzima *Bst*UI), e homozigoto *TP53* 72GG, dois fragmentos de 289 ou 305 pb e 187 pb (dois alelos com o sítio de restrição da enzima). Na figura 10, está representado um esquema ilustrativo da análise molecular do polimorfismo do éxon 4 do gene *TP53*.

A caracterização do genótipos foi feita por dois pesquisadores e aproximadamente 10% das amostras foram reanalisadas. Os genótipos observados foram confirmados por sequenciamento (item 3.12).

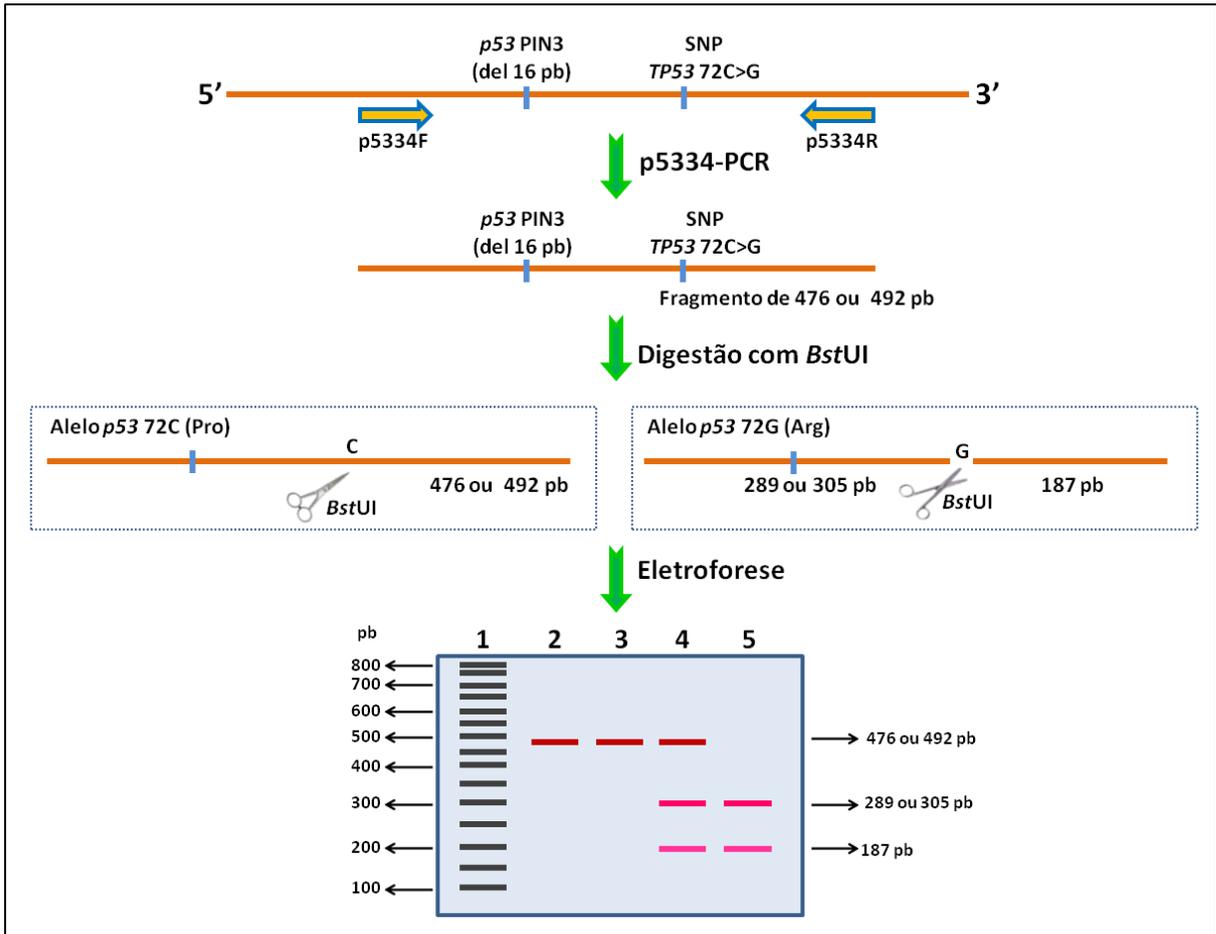


Figura 10: Esquema representativo da análise do polimorfismo do códon 72 do éxon 4 do gene *TP53*. Representação da amplificação dos dois alelos por PCR e os padrões eletroforéticos dos três possíveis genótipos após digestão dos amplicons com a enzima de restrição *Bst*UI. Linha 1: Padrão de peso molecular de 50pb; linha 2: produto de PCR não digerido; linha 3: produto de PCR relativo a um indivíduo homocigoto *TP53 72CC* (um fragmento de 476 pb ou 492 pb); linha 4: produto de PCR relativo a um indivíduo heterocigoto *TP53 72CG* (três fragmentos de 476 pb ou 492 pb, 305 pb ou 289 pb, e 187 pb); linha 5: produto de PCR relativo a um indivíduo homocigoto *TP53 72GG* dois (fragmentos de 289 pb ou 305 pb e 187 pb).

3.9 Análise do polimorfismo do códon 31 do gene *p21*^{WAF1}

3.9.1 Amplificação da região que engloba o polimorfismo do códon 31 (10513C>A) do gene *p21*^{WAF1} – p2131-PCR

A região que inclui o polimorfismo do códon 31 do gene *p21*^{WAF1} foi amplificada pela técnica de PCR (p2131-PCR), utilizando-se os oligonucleotídeos p2131F e p2131R (Quadro 1). A mistura reacional foi composta por tampão de PCR 1X (Tris-HCl 75 mM pH 9,0; KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM; MgCl₂ 2mM -

BIOTOOLS), 40 μM da mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - PHARMACIA), 0,15 μM de cada oligonucleotídeo (p2131F e p2131R), 0,3 U de DNA polimerase (BIOTOOLS), 0,5 μL de solução de DNA genômico e água deionizada estéril para completar o volume final de 25 μL . A reação de amplificação foi realizada em termociclador (BioCycler - modelo MJ967), com a condição de ciclagem especificada no Quadro 2.

Para verificar a especificidade e o rendimento da reação, e o tamanho do amplicon (179 pb), uma alíquota (7 μL) dos produtos das PCRs foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (item 3.11).

3.9.2 Análise do polimorfismo do códon 31 (10513C>A) do gene $p21^{\text{WAF1}}$

O polimorfismo do códon 31 do gene $p21^{\text{WAF1}}$ se caracteriza pela transversão C para A, que resulta no ganho de um sítio de restrição da enzima *BsmAI*. Dessa forma, a análise desse polimorfismo foi realizada pela técnica de PCR-RFLP, consistindo em digestão dos produtos da p21-PCR com a enzima *BsmAI*, que é capaz de reconhecer e clivar a sequência de nucleotídeos (N)₅GAGAC, presente apenas no alelo $p21$ 31A (Arg).

Para a reação de digestão, foram utilizados 1,2 μL de tampão 10X da enzima correspondente (Tampão NEB4, New England Biolabs), 2 U da enzima *BsmAI* (New England Biolabs), 5,0 μL do produto de PCR e água deionizada estéril para completar o volume final de 12 μL . Essa mistura foi incubada por aproximadamente 16 horas a 55°C. Para cada conjunto de reações foram feitos os controles positivo e negativo, conforme descrito no item 3.8.3. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (item 3.10) com tempo de 60 minutos a 100V. Os perfis eletroforéticos dos três possíveis genótipos foram: homozigoto $p21$ 31CC, um único fragmento de 179 pb (presença de dois alelos sem o sítio de restrição da enzima), homozigoto $p21$ 31AA, dois fragmentos de 105 pb e 74 pb (dois alelos com a sequência (N)₅GAGAC reconhecida pela enzima *BsmAI*), e heterozigoto $p21$ 31CA, três fragmentos de 179 pb, 105 pb e 74 pb (um alelo C, que não apresenta o sítio de reconhecimento da enzima, e um alelo A, que contém o sítio de restrição e é clivado pela enzima *BsmAI*). Na figura 11, está representado

um esquema ilustrativo da análise molecular do polimorfismo do códon 31 do gene *p21*.

A identificação dos genótipos foi feita por dois pesquisadores e cerca de 10 % das amostras foram reanalisadas. Os genótipos foram confirmados por sequenciamento dos produtos de PCR (item 3.12).

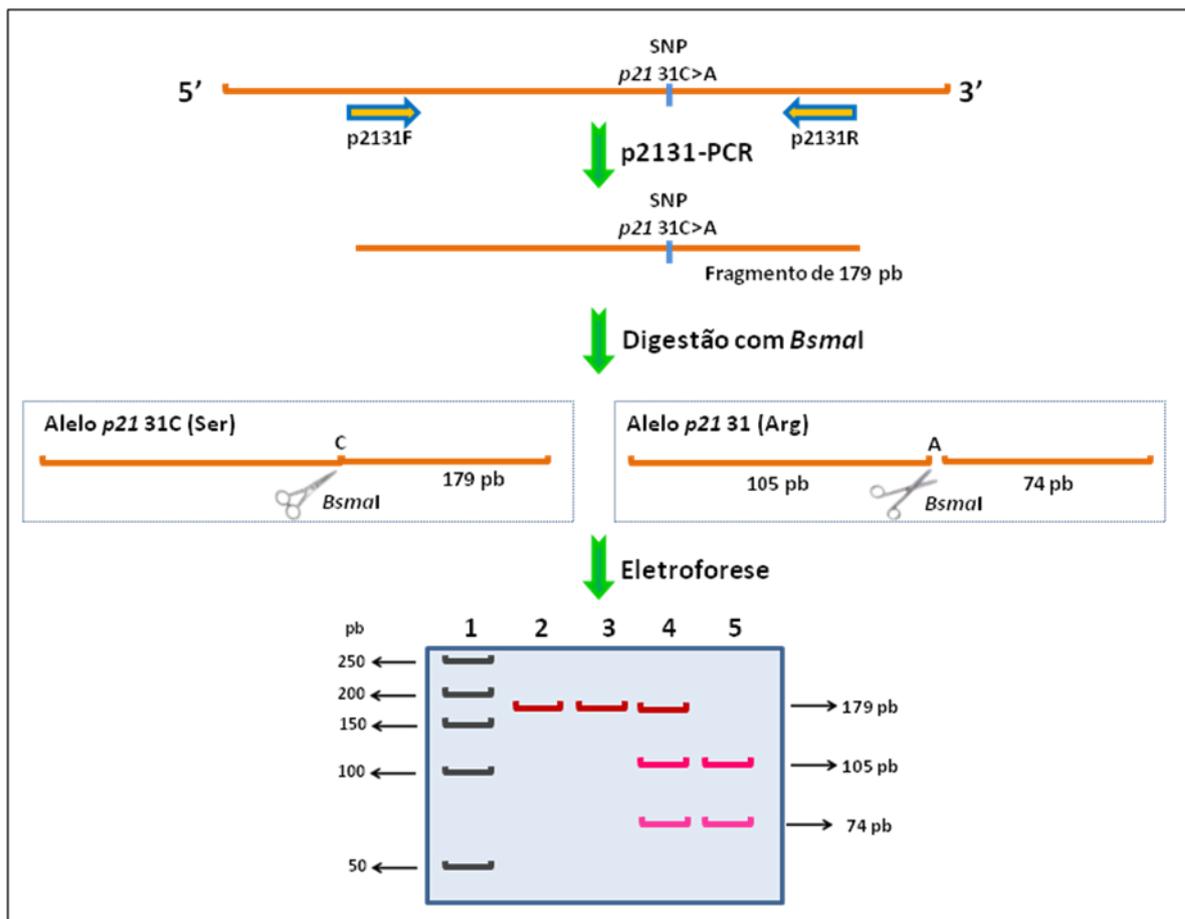


Figura 11: Esquema representativo da análise do polimorfismo do códon 31 do gene *p21*. Representação da amplificação dos dois alelos por PCR e os perfis eletroforéticos dos três possíveis genótipos após a ação da enzima de restrição *Bsmal* sobre os amplicons. Linha 1: Padrão de peso molecular de 50pb; linha 2: produto de PCR não digerido; linha 3: produto de PCR relativo a um indivíduo homozigoto *p21* 31CC (um fragmento de 179 pb); linha 4: produto de PCR relativo a um indivíduo heterozigoto *p21* 31CA (três fragmentos de 179 pb, 105 pb e 74 pb); linha 5: produto de PCR relativo a um indivíduo homozigoto *p21* 31CA (dois fragmentos de 105 pb e 74 pb).

3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Géis de poliacrilamida a 6% e 8% foram empregados, respectivamente, para a avaliação dos produtos de p5334-PCR e análise do polimorfismo *p53* PIN3 (itens 3.8.1 e 3.8.2), e a análise do polimorfismo *p21* 31C>A (item 3.92). As composições das soluções foram adequadas para cada concentração, sendo compostas por 2,0 mL (gel a 6%) ou 2,6 mL (gel a 8%) de acrilamida: bisacrilamida 30% (29/1) (INVITROGEN - LIFE TECHNOLOGIES), 2,0 mL de tampão TBE 5X (Tris-borato 0,45 mM e 0,01 M de EDTA pH 8,0 - MERCK), 100 µL de persulfato de amônio (10%) (APS - PHARMACIA), 10 µL de TEMED (N'N'N'N'tetrametiletenodiamina) (BIO-RAD) e água deionizada necessária para completar o volume de 10 µL.

As soluções foram aplicadas entre duas placas de vidro (10 x 8 x 0,35 cm), previamente lavadas com saponáceo cremoso, limpas com álcool 95% e montadas com espaçadores presos com *Binder Clips*, e, em seguida, o pente foi posicionado para a formação dos poços de aplicação das amostras. Após a polimerização do gel, o pente foi retirado, as placas foram posicionadas em cuba vertical (modelo V 8.10 – LIFE TECHNOLOGIES) e adicionou-se TBE 1X até a completa imersão do gel e dos eletrodos.

Para avaliação dos produtos de p5334-PCR e análise do polimorfismo *p53* PIN3 foram aplicados no gel 3 µL de produto de PCR misturados com 1/10 do volume do tampão de corrida 10X (50% glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol - PHARMACIA). A corrida eletroforética ocorreu a 100 V por 2 horas. Na análise do polimorfismo *p21* 31C>A, todo o volume da reação de digestão com a enzima *BsmI* (12 µL) adicionado de 1/10 do volume do tampão de corrida foi aplicado no gel. A corrida eletroforética ocorreu também a 100 V, mas por 60 minutos. Ao término da corrida eletroforética, as placas foram desmontadas para coloração do gel. Este foi, então, imerso em uma solução de brometo de etídeo (5 µg/mL) por 1 minuto. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline - modelo TVD 2000R) acoplado a um sistema de captura de imagem (fotografia) digital (Canon – modelo PC1250), o gel foi fotografado e as imagens registradas e arquivadas.

3.11 Eletroforese em gel de agarose

Géis de agarose a 1,5% e 2% foram utilizados, respectivamente, na avaliação dos produtos da p2131-PCR (3.9.1) e na análise do polimorfismo *TP53 72C>G* (item 3.8.3). A agarose (PHARMACIA) foi pesada de acordo com a concentração requerida (0,45 g para gel a 1,5% e 0,6 g para gel a 2%), e adicionada a 30 mL de TAE 1X (0,04 M de Tris-acetato; 1mM de EDTA - pH 8,5, MERCK). A mistura foi submetida ao calor, em forno de micro-ondas, até a completa dissolução da agarose. Quando necessário, o volume final foi completado com água destilada. Em seguida, a solução foi resfriada e transferida para o suporte previamente montado de uma cuba horizontal (Modelo Horizon 58 - Life Technologies), e os pentes necessários para a formação dos poços foram posicionados. Após gelificação, os pentes foram retirados e adicionou-se tampão TAE 1X em quantidade suficiente para a completa imersão do gel.

No gel, foram aplicados 7 µL de produto da p2131-PCR ou todo o volume (12 µL) da reação de digestão com a enzima *Bst*UI (análise do polimorfismo *TP53 72C>G*) adicionados de 1/10 do volume de tampão de corrida 10X. A corrida eletroforética foi realizada a 110 V com duração de 14 minutos, na análise dos produtos da p2131-PCR, ou 25 minutos, na análise do polimorfismo *TP53 72C>G*. Concluída a corrida eletroforética, procedeu-se a imersão do gel em solução de brometo de etídeo (5 µg/mL) por cerca de 5 minutos. As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline - modelo TVD 2000R) acoplado a um sistema de captura de imagem (fotografia) digital (Canon – modelo PC1250), o gel foi fotografado e o registro da imagem foi arquivado.

3.12 Sequenciamento de DNA

A técnica de sequenciamento de DNA foi utilizada para confirmar os genótipos identificados pelas técnicas empregadas na análise dos polimorfismos dos genes *TP53* e *p21* previamente descritas.

3.12.1 Purificação do produto de PCR

Foram realizadas novas reações de amplificação e os produtos de PCR foram purificados usando o *AccuPrep*® PCR Purification Kit (BIONEER), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, 5 partes do tampão 1 foi misturado com o produto de PCR em vórtex. Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo contendo a coluna de ligação do DNA, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. A solução que restou no tubo foi, então, descartada e foram adicionados 500 µL do tampão 2 na coluna, para retirada de sais e impurezas. O tubo contendo a coluna foi novamente centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto e a solução que permaneceu no tubo foi descartada. Esta última etapa foi repetida e, após mais uma centrifugação a coluna foi transferida para um tubo de 1,5mL (EPPENDORF). Foi feita a adição de 20 µL de tampão 3, para eluição do fragmento de DNA ligado à coluna, seguida de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, a coluna foi descartada e a solução de DNA resultante foi armazenada a -20°C.

3.12.2 Reação de sequenciamento

Foi preparada uma mistura reacional contendo 1,5 µL de tampão de Big Dye, 1,0 µL de Big Dye 3.1 (LIFE TECHNOLOGIES), 0,3 µM ou 0,15 µM de um dos oligonucleotídeos utilizados na p5334-PCR ou p3121-PCR, respectivamente (Quadro 1), 2 a 4 µL do produto de PCR purificado e água deionizada estéril para completar um volume final de 20 µL. O tubo contendo a mistura foi levado a um termociclador (VERITI - LIFE TECHNOLOGIES), no qual se empregou uma sequência de eventos constituída de uma etapa inicial de pré-desnaturação a 96°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos contendo três fases: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Uma etapa final de 4°C foi feita até a retirada do tubo do termociclador.

3.12.3 Precipitação dos produtos da reação

Para a precipitação do DNA a ser sequenciado, foram adicionados 80 µL de isopropanol a 65% (Merck) ao tubo contendo a reação de sequenciamento, seguido de agitação em vórtex, incubação por 15 minutos em ausência de luz e centrifugação a 4°C por uma hora a 3.500 rpm (HERMLE, modelo Z 323 K) .O sobrenadante foi descartado, delicadamente, e foram adicionados 200 µL de etanol 60% (Merck) seguido de agitação em vórtex e nova centrifugação a 4°C por 30 minutos a 3.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, delicadamente, e o tubo foi centrifugado invertido sobre papel toalha para secagem completa do precipitado por 1 minuto a 700 rpm.

3.12.4 Desnaturação e sequenciamento

Ao tubo contendo a amostra precipitada foram adicionados 10 µL de formamida (LIFE TECHNOLOGIES). Após uma leve agitação, o tubo foi incubado a 98°C por 5 minutos e transferido rapidamente para um banho de gelo, onde foi mantido por no mínimo 30 segundos. A amostra foi, então, aplicada ao sequenciador automático (ABI3130 e ABI3500 – Life Technologies) do laboratório HLA da UERJ, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A sequência resultante foi analisada pelos programas BioEdit e LaserGene.

3.13 **Análise estatística**

A análise estatística das variáveis epidemiológicas foi realizada por meio de análise descritiva dos dados demográficos utilizando média com desvio padrão e mediana. A análise de comparação as variáveis contínuas (idade, sexarca, nº de gestações, nº de partos e renda familiar) nos grupos de casos e controles foi realizada pelo teste T de Student. Já a análise comparativa das variáveis descontínuas (raça, nº de parceiros, classe sócio-econômica e escolaridade) nos dois grupos foi feita por meio do teste do qui-quadrado de Pearson.

Tabagismo, anticoncepção e história de doença sexualmente transmissível (DST) foram consideradas variáveis binárias e sua análise foi feita pelo teste do χ^2 . Utilizou-se o programa Statistica 8.0, Stat Soft. Inc., Tulsa – USA.

As distribuições genóticas correspondentes aos polimorfismos dos genes *TP53* e *p21^{WAF1}* foram avaliadas segundo o princípio de Hardy-Weinberg por meio de teste do χ^2 , utilizando um programa disponível na página <http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm>

As análises comparativas entre as distribuições genóticas e alélicas relativas aos polimorfismos nos genes *TP53* (*p53* PIN3 e *p53* 72C>G) e *p21^{WAF1}* (*p21* 31C>A) nos grupos de casos e controle foram realizadas, tendo sido calculadas as razões de chance (*Odds Ratio*, OR) para cada genótipo ou alelo em relação ao genótipo ou alelo de referência (mais comum na população). Também foram feitas as comparações entre as distribuições genóticas e alélicas do grupo controle em relação aos subgrupos de casos (LSIL e HSIL+câncer invasor) e dos dois subgrupos de casos. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad InStat versão 3.01.

As possíveis associações entre positividade de expressão dos biomarcadores p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67, bem como a positividade imunohistoquímica para HPV *pool* e HPV 16, nos diferentes grupos de neoplasias cervicais foram avaliadas pelo teste do χ^2 . Foi também calculado o coeficiente de correlação de Pearson para medir a força de correlação entre a distribuição epitelial de expressão dos biomarcadores, positividade imunohistoquímica para HPV *pool* e HPV 16 e os graus das lesões cervicais, sendo considerado: $r < 0,4$ - correlação fraca; $0,4 < r < 0,7$ - correlação moderada e $r > 0,7$ correlação forte. Para as análises de combinação de genótipos e as análises de interação entre os polimorfismos e a expressão imunohistoquímica dos biomarcadores foi empregado o teste do χ^2 . Essas análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.

As análises das interações entre os polimorfismos estudados com os fatores de risco e as análises multiplicativas de alelos foram realizadas por meio de regressão logística no programa SNPStats disponível na página da internet do Instituto Catalan de Oncologia: <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>.

A análise multiplicativa de alelos no modelo ajustado para as covariáveis foi estimada pelo modelo de máxima verossimilhança, tendo sido empregado o programa R versão 2.12.0 utilizando os pacotes Genetics, Design e Combinat.

Para todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 População de estudo

A população de estudo foi composta por 466 mulheres reunidas em dois grupos. O grupo de casos foi composto por 281 pacientes, que foram classificadas em três subgrupos de acordo com o laudo histopatológico da biópsia ou peça cirúrgica, representados por: mulheres com LSIL (96 pacientes), HSIL (161 pacientes) e câncer (24 pacientes, sendo 22 casos de carcinoma de células escamosas e 2 casos de adenocarcinoma). O grupo controle foi composto por 185 mulheres com laudo citológico sem alterações significativas ou com alterações inflamatórias inespecíficas e sem história pregressa de neoplasia cervical.

4.1.1 Características sociodemográficas da população de estudo

A média de idade (\pm dp) das participantes no momento da inclusão do estudo foi, no grupo de casos, $38,5 \pm 11,5$ anos (14-80 anos), com uma mediana de 37,6 anos, e no grupo controle, $36,9 \pm 10,1$ anos (17-66 anos), com uma mediana de 39,0 anos, sem diferença significativa entre os dois grupos.

Na Tabela 1, encontram-se as características pessoais e os aspectos comportamentais potencialmente de risco para o desenvolvimento de neoplasias cervicais nos grupos controle e de casos. Os dois grupos apresentaram diferenças significativas apenas com relação à história de familiar de câncer ($p= 0,004$), história prévia de DST ($p < 0,001$) e ao uso de método contraceptivo ($p < 0,001$).

Tabela 1: Características sociodemográficas das integrantes dos grupos de casos e controles.

Característica sociodemográfica	Casos*		Controles*	Casos vs Controles		LSIL vs Controle		HSIL+câncer vs Controle		HSIL+câncer vs LSIL	
	LSIL	HSIL+câncer		OR (IC 95%)	p**	OR (IC 95%)	p**	OR (IC 95%)	p**	OR (IC 95%)	p**
	n/Total	n/Total		n/Total	n/Total	n/Total	n/Total	n/Total	n/Total	n/Total	n/Total
História familiar de câncer											
Sim	56/96	88/184	69/183	1,749 (1,20-2,56)	0,004	2,313 (1,40-3,83)	0,002	1,514 (0,99-2,30)	0,058	0,655 (0,40-1,08)	0,103
DST prévia											
Sim	47/96	78/181	40/154	2,344 (1,52-3,61)	<0,001	2,734 (1,60-4,68)	<0,001	2,158 (1,36-3,44)	0,001	0,789 (0,48-1,30)	0,376
Nº. de parceiros sexuais											
≥ 5	28/90	49/175	30/145	1,570 (0,97-2,54)	0,078	4,761 (2,82-8,03)	<0,001	1,491 (0,89-2,51)	0,152	0,861 (0,49-1,50)	0,668
Hábito de fumar											
Fumante ou ex-fumante	60/96	94/184	91/185	1,263 (0,87-1,83)	0,255	1,722 (1,04-2,85)	0,043	1,079 (0,71-1,62)	0,755	0,628 (0,38-1,04)	0,077
Uso de contraceptivo											
Sim	53/96	124/184	155/185	0,333 (0,21-0,53)	<0,001	0,239 (0,14-0,42)	<0,001	0,400 (0,24-0,66)	<0,001	1,677 (1,01-2,78)	0,051
Nº. de Gestações											
≥ 5	8/94	21/185	14/185	1,406 (0,72-2,74)	0,332	1,110 (0,45-2,75)	0,818	1,564 (0,77-3,18)	0,286	1,409 (0,60-3,31)	0,537
Nº. de Partos											
≥ 5	4/96	11/185	5/184	2,019 (0,72-5,66)	0,243	1,557 (0,41-5,94)	0,498	2,263 (0,77-6,65)	0,200	1,454 (0,45-4,70)	0,793
Sexarca											
≤16 anos	64/96	120/185	134/185	1,385 (0,92-2,08)	0,128	0,76 (0,45-1,30)	0,336	0,703 (0,45-1,09)	0,145	0,923 (0,55-1,55)	0,793
Menarca											
≤13 anos	57/96	109/185	100/185	0,815 (0,56-1,18)	0,294	0,805 (0,49-1,33)	0,448	0,820 (0,54-1,24)	0,402	1,019 (0,62-1,68)	1,000
Etnia											
Branca	44/96	51/183	50/185	1,394 (0,93-2,10)	0,125	2,285 (1,36-3,83)	0,002	1,043 (0,66-1,65)	0,907	0,457 (0,27-0,76)	0,003
Educação formal											
≤ ensino fundamental	67/96	118/183	129/185	1,170 (0,78-1,75)	0,178	0,997 (0,58-1,71)	1,000	1,269 (0,82-1,96)	0,318	0,786 (0,46-1,34)	0,425

* Denominadores diferentes por ausência de dados nos questionários.

** Teste exato de Fisher.

A análise comparativa também foi realizada considerando dois subgrupos, pacientes com LSIL e pacientes com HSIL ou câncer invasivo. A comparação entre o grupo controle e o subgrupo LSIL revelou diferença com relação às seguintes características: história familiar de câncer ($p= 0,002$), história prévia de DST ($p< 0,001$), número de parceiros sexuais maior ou igual a cinco ($p< 0,001$), ser fumante ou ter fumado no passado ($p= 0,043$), uso de método contraceptivo ($p< 0,001$) e cor de pele/etnia (não brancas e brancas) ($p= 0,002$) (Tabela 1). Entretanto, o subgrupo HSIL+câncer se mostrou diferente do grupo controle somente com respeito à história prévia de DST ($p< 0,001$) e ao uso de método anticoncepcional ($p< 0,001$) (Tabela 1).

Já as mulheres com LSIL e mulheres com HSIL ou câncer não apresentaram características sociodemográficas diferentes, exceto com relação à etnia e ao uso de método anticoncepcional, em que mulheres brancas foram menos prevalentes no grupo de HSIL + câncer (OR = 0,457; IC 95% = 0,27-0,76; $p=0,003$) e mulheres que fazem uso método anticoncepcional prevaleceram no grupo de lesão mais severa (OR = 1,677; IC 95% = 1,01-2,78; $p=0,051$) (Tabela 1).

4.2 Análise dos polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G

Um único par de oligonucleotídeos foi utilizado para amplificar a região contendo os polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G nas 466 amostras (casos e controles) pela técnica de PCR (*p5334*-PCR) (item 3.8.1).

Para a análise do polimorfismo *p53* PIN3 (duplicação de 16 pb), os produtos de PCR obtidos foram diretamente submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (item 3.8.2). Na figura 12, podem ser observados os padrões eletroforéticos dos três possíveis genótipos. Amostra representativa de indivíduos homocigotos A2/A2 (dois alelos com a duplicação de 16 pb) apresentam um único fragmento de 492 pb (linha 1). Já a amostra de um indivíduo homocigoto A1/A1 (dois alelos sem a duplicação de 16 pb) exibe um fragmento de 476 pb (linha 4). A linha 3 apresenta dois fragmentos de 476 e 492 pb correspondentes a uma amostra representativa de indivíduos heterocigotos A1/A2 (que contêm um alelo sem e outro com a duplicação de 16 pb).

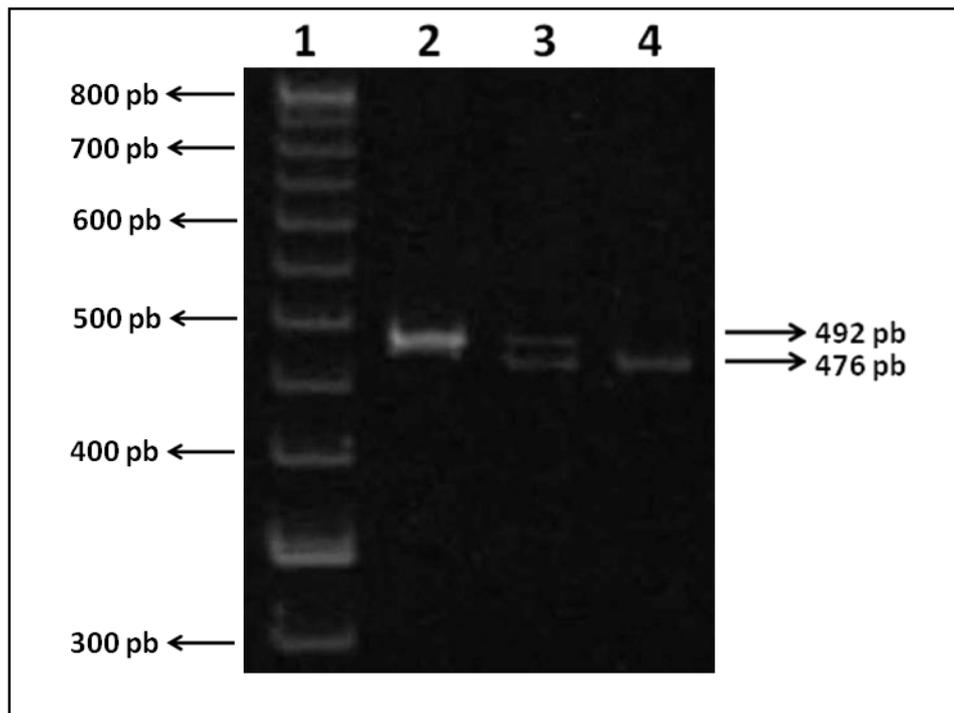


Figura 12: Análise molecular do polimorfismo *p53* PIN3. Fotografia de um gel de poliacrilamida a 6% corado com brometo de etídeo usado na análise dos amplicons da *p53*34-PCR. Linha 1: Padrão de peso molecular – 50 pb DNA Ladder (INVITROGEN), linha 2: Homozigoto A2/A2 (dois alelos com a duplicação de 16 pb); linha 3: Heterozigoto A1/A2 (um alelo com e outro sem a duplicação de 16 pb); linha 4: Homozigoto A1/A1 (dois alelos sem a duplicação de 16 pb).

O estudo molecular do polimorfismo *p53* 72C>G foi realizado por PCR-*Bst*UI RFLP, conforme descrito no item 3.8.3. Na figura 13, é possível identificar os três genótipos desse polimorfismo, que são: C/C, que apresenta dois alelos sem o sítio de restrição da enzima (banda de 476 ou 492 pb, de acordo com a alteração *p53* PIN3); C/G, composto por um alelo sem e outro com o sítio de reconhecimento da enzima (bandas de 476 ou 492 pb, 289 ou 305 pb e 187 pb); e G/G, caracterizado pela presença de dois alelos com o sítio de restrição da enzima (duas bandas de 289 ou 305 pb e 187 pb).

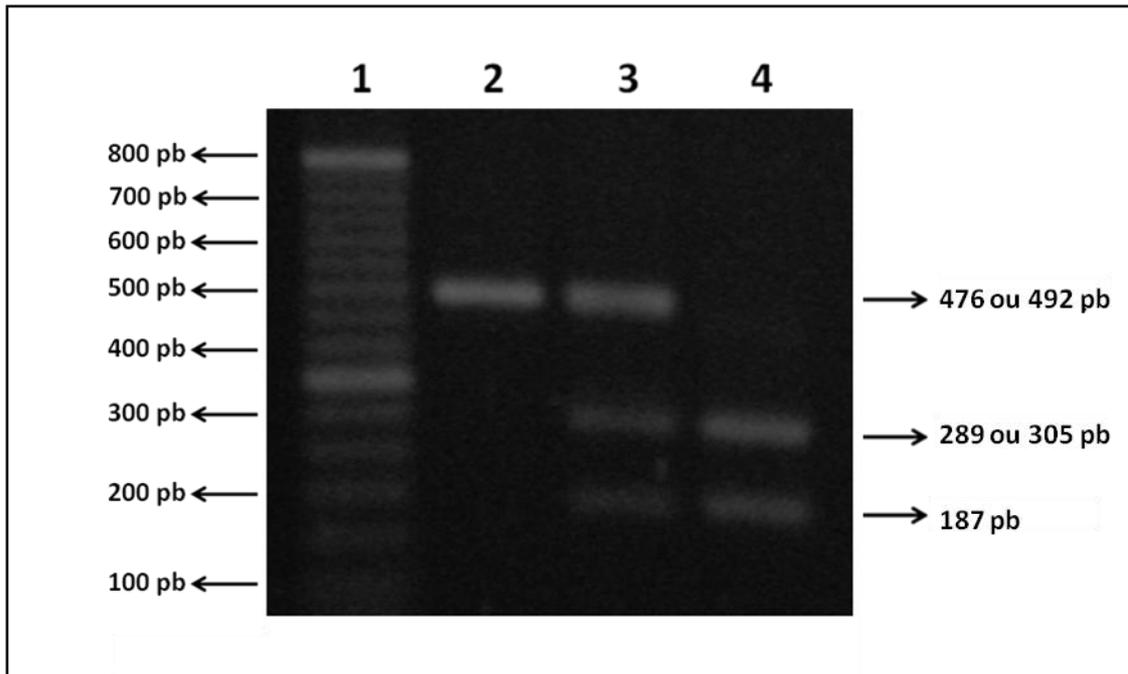


Figura 13: Análise molecular do polimorfismo *p53 72C>G*. Fotografia de um gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo usado na análise dos produtos da digestão dos amplicons da *p5334-PCR* com a enzima de restrição *Bst*UI. Linha 1: Padrão de peso molecular - 50pb DNA Ladder (INVITROGEN), linha 2: Homozigoto C/C (dois alelos sem o sítio de restrição da enzima); linha 3: Heterozigoto C/G (um alelo com e outro sem o sítio de reconhecimento da enzima); linha 4: Homozigoto G/G (dois alelos reconhecidos e clivados pela enzima).

4.3 Análise do polimorfismo *p21 31C>A*

Após a PCR e a confirmação do tamanho dos amplicons, os mesmos foram digeridos com a enzima de restrição *Bsm*AI, conforme descrito no item 3.9.1. Os produtos das digestões foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (item 3.10). A figura 14 ilustra os três genótipos correspondentes ao polimorfismo *p21 31C>A* que são: C/C, representado por dois alelos sem o sítio de restrição da enzima (banda de 179 pb); C/A, composto por um alelo sem e outro com o sítio de reconhecimento da enzima (bandas de 179, 105 e 74 pb); e A/A, identificado pela presença de dois alelos que contêm o sítio de restrição da enzima (dois fragmentos de 105 e 74 pb).

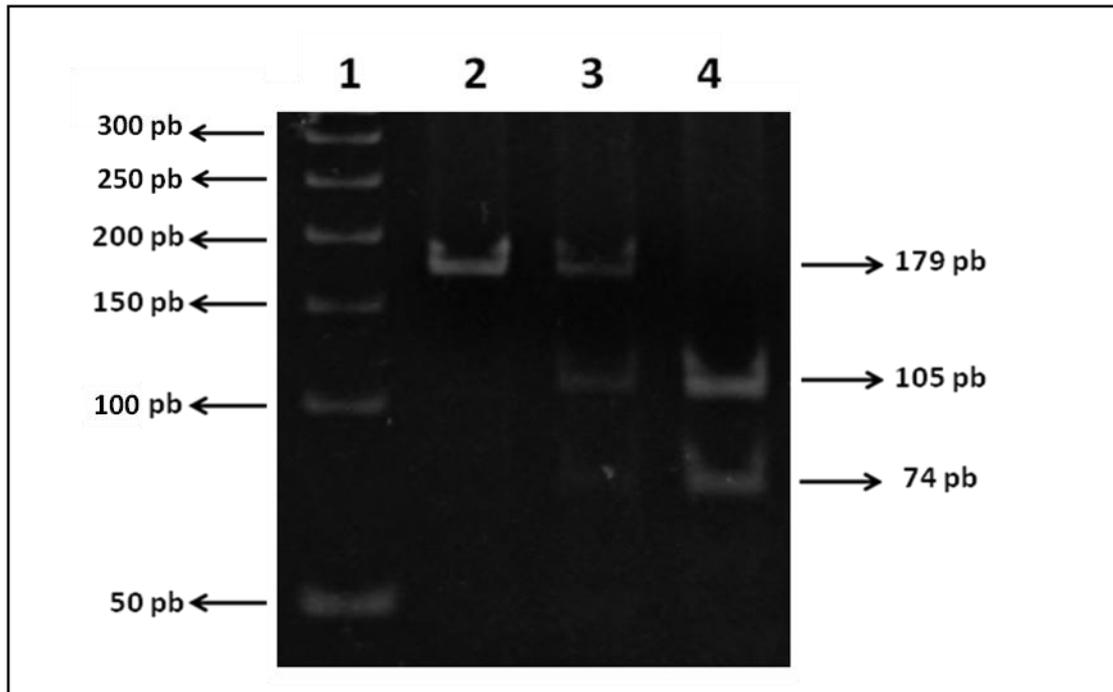


Figura 14: Análise molecular do polimorfismo *p21* 31C>A. Fotografia de um gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídeo usado na análise do produto da digestão dos amplicons da *p21*31-PCR com a enzima de restrição *Bsm*AI. Linha 1: Padrão de peso molecular - 50pb DNA Ladder (INVITROGEN), linha 2: Homozigoto C/C (dois alelos sem o sítio de restrição da enzima); linha 3: Heterozigoto C/A (um alelo com e outro sem o sítio de reconhecimento da enzima); linha 4: Homozigoto A/A (dois alelos reconhecidos e clivados pela enzima).

4.4 Confirmação dos genótipos correspondentes aos polimorfismos estudados por sequenciamento de DNA

O sequenciamento de amostras representativas dos genótipos correspondentes aos três polimorfismos estudados permitiu confirmar a classificação genotípica previamente realizada pela técnica de PCR-RFLP. Nas figuras 15, 16 e 17, são apresentados os eletroferogramas de amostras representativas dos genótipos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A, respectivamente.

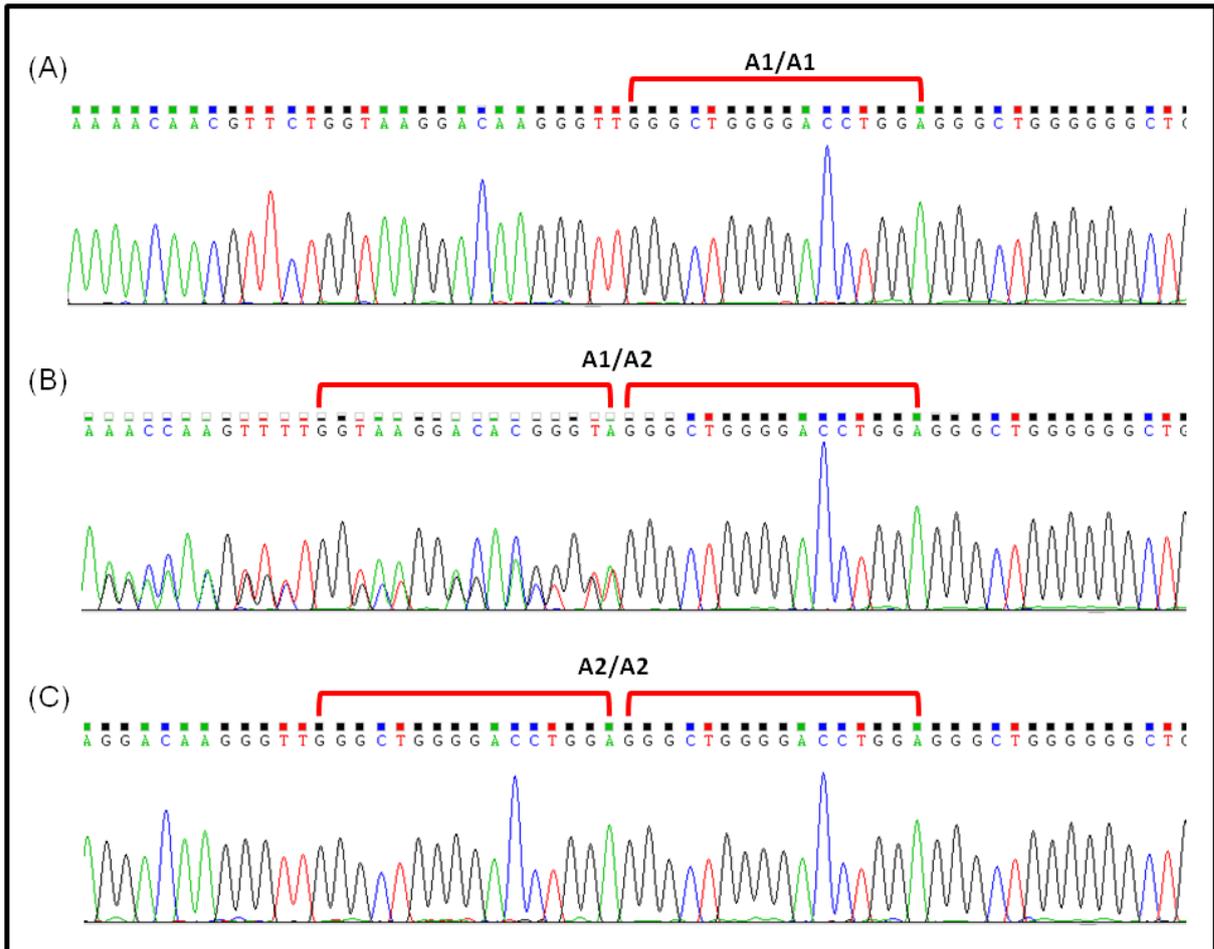


Figura15: Imagem de resultados de sequenciamento da região contendo o polimorfismo *p53* PIN3. Eletroferogramas representativos do genótipo *p53* PIN3 A1/A1 (A) e *p53* PIN3 A1/A2 (B) e *p53* PIN3 A2/A2. O colchete vermelho delimita a sequência de 16 pb que pode se apresentar duplicada.

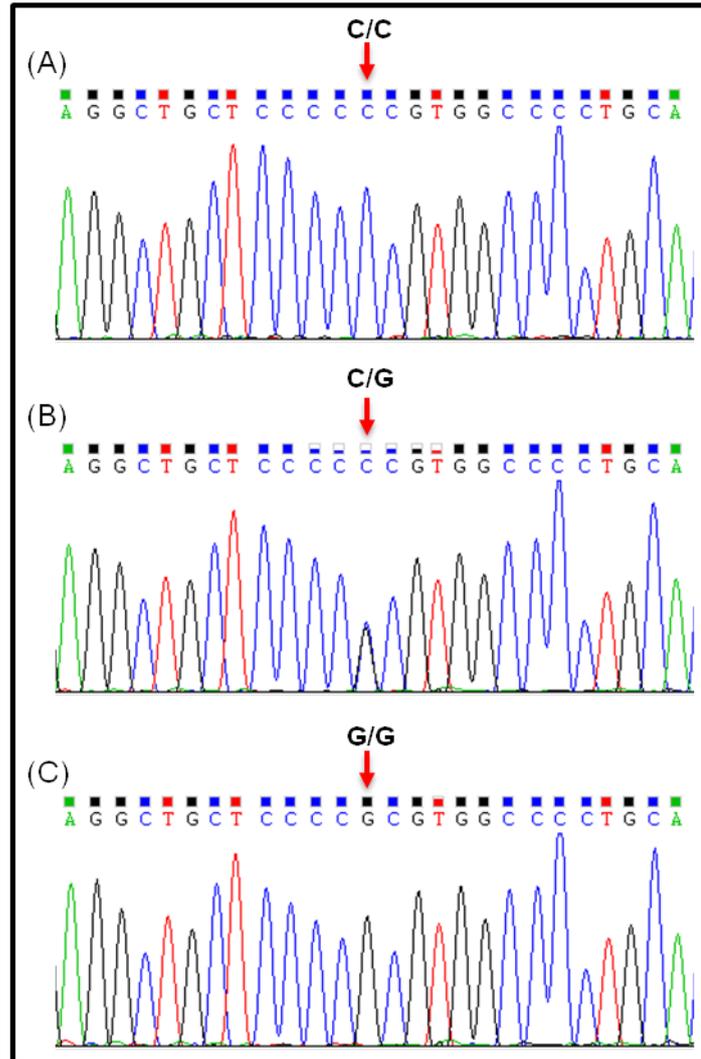


Figura16: Imagem de resultados de sequenciamento da região contendo o polimorfismo *p53* 72C>G. Eletroferogramas representativos dos genótipos *p53* 72CC (A) e *p53* 72CG (B) e *p53* 72GG (C). As setas vermelhas indicam a posição do *loci* polimórfico.

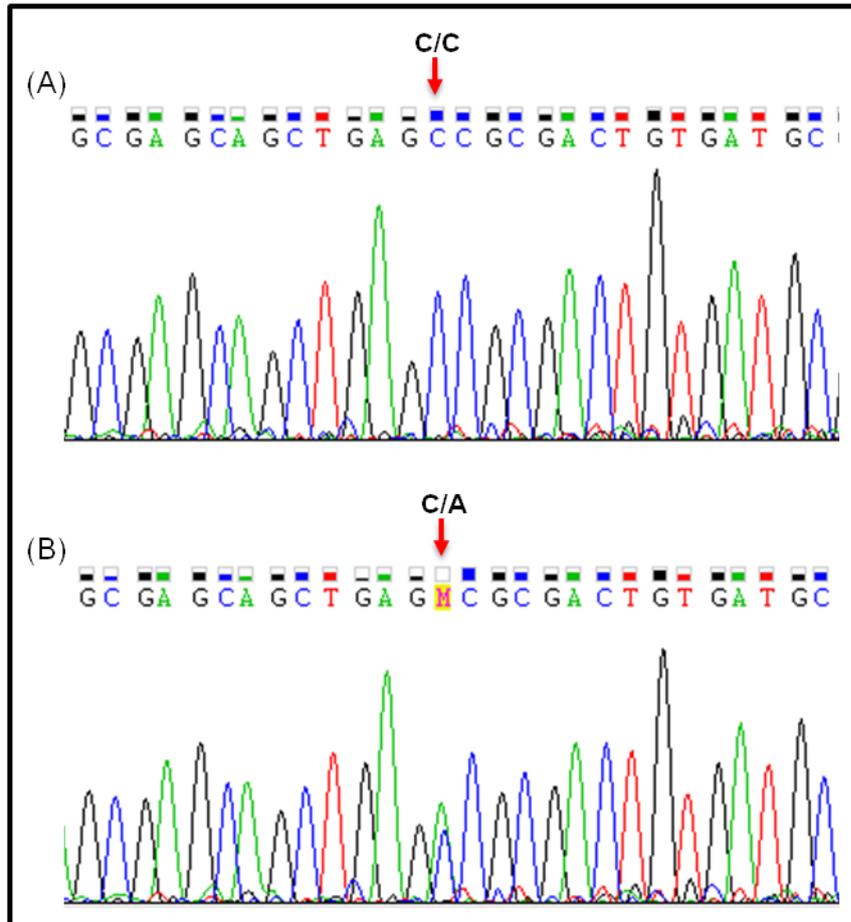


Figura 17: Imagem de resultados de sequenciamento da região contendo o polimorfismo *p21* 31C>A. Eletroferogramas representativos do genótipo *p21* 31 CC (A) e *p21* 31 CA (B). A seta vermelha indica a posição do *loci* polimórfico.

4.5 Avaliação do equilíbrio genético de Hardy-Weinberg nos grupos de estudo com relação aos polimorfismos dos genes *TP53* e *p21*

A comparação entre as frequências genotípicas observadas e esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg foi feita utilizando-se o teste do χ^2 (Tabela 2). Com relação aos polimorfismos *p53* PIN3 e *p21* 31C>A, os dois grupos de estudo (casos e controle) e os subgrupos de casos (LSIL e HSIL+câncer) encontram-se em equilíbrio. O mesmo foi observado com respeito ao grupo controle e ao subgrupo de casos LSIL com relação ao polimorfismo *p53* 72C>G. Entretanto, as frequências genotípicas observadas no grupo de casos e no subgrupo HSIL+câncer não estavam de acordo com os valores esperados ($\chi^2 = 4,408$; $p=0,036$ e $\chi^2 = 5,569$;

$p=0,01$, respectivamente), indicando que os grupos analisados não obedeceram ao princípio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2: Teste de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg nos grupos e subgrupos de estudo.

Polimorfismo	Grupo de estudo	χ^2	p^*
TP53 PIN 3	Controle	2,661	0,103
	Casos	1,621	0,203
	LSIL	0,026	0,870
	HSIL+câncer	1,309	0,252
TP53 códon 72	Controle	0,158	0,691
	Casos	4,408	0,036
	LSIL	0,036	0,849
	HSIL+câncer	5,569	0,01
p21 códon 31	Controle	0,030	0,862
	Casos	0,324	0,569
	LSIL	1,195	0,274
	HSIL+câncer	0,019	0,892

* Valores estimados utilizando-se grau de liberdade igual a 1.

4.6 Distribuições genóticas e alélicas do polimorfismo p53 PIN 3 nos grupos controle e de casos e nos subgrupos LSIL e HSIL+câncer

As análises comparativas das distribuições genóticas e alélicas correspondentes ao polimorfismo p53 PIN 3 entre o grupo controle e o grupo total de casos, o subgrupo LSIL e o subgrupo HSIL+câncer, e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer não revelaram diferenças significativas quando realizada de modo independente ou aplicando o modelo dominante, tendo como referência o genótipo ou o alelo mais frequente (Tabela 3). As distribuições alélicas relativas a este polimorfismo apresentaram frequências muito semelhantes entre os grupos controle e de casos.

4.7 Distribuições genóticas e alélicas do polimorfismo *p53* 72C>G nos grupos controle e de casos e nos subgrupos LSIL e HSIL+câncer

Não foram observadas diferenças significativas das distribuições genóticas e alélicas correspondentes ao polimorfismo *p53* 72C>G (Pro/Arg) entre os grupos de casos e controles, ou quando comparamos controle com os subgrupos LSIL e HSIL+câncer ou entre os subgrupos de casos (Tabela 4). Também não foi observada diferença quando realizada a análise combinada dos genótipos heterozigoto *p53* 72C/G (Pro/Arg) e homozigoto raro *p53* 72C/C (Pro/Pro), tendo como referência o homozigoto mais frequente, *p53* 72G/G (Arg/Arg), entre os mesmos grupos de comparação acima descritos.

Tabela 3: Análise comparativa das frequências genotípicas e alélicas correspondentes ao polimorfismo *p53* PIN3 entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

SNP	Genótipo ou alelo	Casos		Controle n=177	Casos vs Controle		LSIL vs Controle		HSIL+câncer vs Controle		HSIL+câncer vs LSIL	
		LSIL n=94	HSIL+câncer n=176		OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *
		n (%) ou n (f)	n (%) ou n (f)	n (%) ou n (f)								
<i>p53</i> PIN3	A1/A1	65 (69,2)	119 (67,6)	122 (68,9)	referência		referência		referência		referência	
	A1/A2	26 (27,7)	48 (27,3)	46 (26)	1,07 (0,69-1,65)	0,83	1,06 (0,60-1,87)	0,88	1,07 (0,66-1,72)	0,81	1,01 (0,57-1,77)	1,00
	A2/A2	3 (3,2)	9 (5,1)	9 (5,1)	0,88 (0,36-2,16)	0,82	0,63 (0,16-2,39)	0,75	1,03 (0,39-2,67)	1,00	1,64 (0,43-6,27)	0,55
	A1/A1 vs A1/A2+A2/A2	29 (30,9)	57 (32,4)	55 (31,1)	1,04 (0,69-1,56)	0,92	0,99 (0,58-1,70)	1,00	1,06 (0,68-1,66)	0,82	1,07 (0,63-1,84)	0,89
	Alelo A1	156 (0,83)	286 (0,81)	290 (0,82)	referência		referência		referência		referência	
	Alelo A2	32 (0,17)	66 (0,19)	64 (0,18)	1,00 (0,71-1,42)	1,00	0,93 (0,58-1,42)	0,81	1,05 (0,71-1,53)	0,85	1,13 (0,71-1,79)	0,64

*Teste de Fisher

Tabela 4: Análise comparativa das frequências genóticas e alélicas correspondentes ao polimorfismo *p53* 72C>G entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

SNP	Genótipo ou alelo	Casos		Controle n=175	Casos vs Controle		LSIL vs Controle		HSIL+câncer vs Controle		HSIL+câncer vs LSIL	
		LSIL n=93	HSIL+câncer n=176		OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *
		n (%) ou n (f)	n (%) ou n (f)	n (%) ou n (f)								
<i>p53</i> 72C>G	G/G	35 (37,6)	65 (36,9)	59 (33,7)	referência		referência		referência		referência	
	G/C	44 (47,3)	70 (39,8)	83 (47,4)	0,81 (0,53-1,24)	0,38	0,89 (0,51-1,56)	0,77	0,76 (0,48-1,23)	0,27	0,86 (0,49-1,50)	0,67
	C/C	14 (15,1)	41 (23,3)	33 (18,9)	0,98 (0,57-1,68)	1,00	0,71 (0,34-1,52)	0,45	1,13 (0,63-2,018)	0,77	1,58 (0,76-3,28)	0,28
	G/G vs G/C+C/C	58 (62,4)	111 (63,1)	116 (66,3)	0,86 (0,58-1,28)	0,48	0,84 (0,50-1,42)	0,59	0,89 (0,56-1,35)	0,58	1,03 (0,61-1,73)	1,0
	Alelo G	114 (0,61)	200 (0,57)	201 (0,57)	referência		referência		referência		referência	
	Alelo C	72 (0,39)	152 (0,43)	149 (0,43)	0,96 (0,73-1,26)	0,78	0,85 (0,59-1,22)	0,41	1,02 (0,76-1,38)	0,88	1,2 (0,84-1,73)	0,36

*Teste de Fisher

4.8 Distribuições genotípicas e alélicas do polimorfismo *p21 31C>A* nos grupos controle, de casos e os subgrupos LSIL e HSIL+câncer

Em relação ao polimorfismo *p21 31C>A*, a análise comparativa dos genótipos de modo independente, tendo como referência o genótipo mais comum, *p21 31CC* (Ser/Ser), não revelou diferença significativa entre o grupo controle e o subgrupo LSIL e entre os subgrupos de casos LSIL e HSIL+câncer (Tabela 5). Entretanto, o genótipo homozigoto *p21 31AA* (Arg/Arg) foi menos frequente no grupo de casos quando comparado com o grupo controle (OR = 0,36; IC 95% = 0,14-0,96, $p=0,04$) e essa diferença se manteve no modelo dominante (C/C vs C/A + A/A) em que os indivíduos com genótipos contendo pelo menos um alelo A apresentaram uma menor chance de desenvolver neoplasia cervical (OR = 0,66; IC = 0,44-0,97, $p=0,04$). Essa associação se manteve apenas entre o grupo controle e o subgrupo HSIL+câncer, em que resultados significativos foram obtidos tanto em relação ao genótipo heterozigoto *p21 31CA* (Ser/Arg), que se mostrou menos frequente no subgrupo de pacientes com lesão mais grave (OR = 0,61; IC 95% = 0,39-0,97, $p=0,04$), como no modelo dominante (C/C vs C/A + A/A) (OR = 0,58; IC 95% = 0,37-0,90, $p=0,02$). Esses resultados foram confirmados pela análise comparativa das frequências alélicas entre os grupos e subgrupos. O alelo *p21 31A* (Arg) representou um fator de proteção para o desenvolvimento de neoplasia cervical em geral (OR = 0,67; IC 95% = 0,48-0,92, $p=0,02$) e, em especial, para o desenvolvimento de lesões mais graves (HSIL ou câncer) (OR = 0,61; IC 95% = 0,42-0,88, $p=0,01$).

Tabela 5: Análise comparativa das frequências genótípicas e alélicas correspondentes ao polimorfismo *p21* 31C>A entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

SNP	Genótipo ou alelo	Casos		Controle n=179	Casos vs Controle		LSIL vs Controle		HSIL+câncer vs Controle		HSIL+câncer vs LSIL	
		LSIL n=93	HSIL+câncer n=177		OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)	<i>p</i> *
		n (%) ou n (f)	n (%) ou n (f)									
<i>p21</i> 31C>A	C/C	58 (62,4)	124 (70,1)	103 (57,5)	referência		referência		referência		referência	
	C/A	33 (35,5)	48 (27,1)	65 (36,3)	0,71 (0,47-1,06)	0,10	0,90 (0,53-1,53)	0,79	0,61 (0,39-0,97)	0,04	0,68 (0,40-1,17)	0,21
	A/A	2 (2,1)	5 (2,8)	11 (6,2)	0,36 (0,14-0,96)	0,04	0,32 (0,07-1,51)	0,22	0,38 (0,13-1,12)	0,12	1,17 (0,22-6,21)	1,00
	C/C vs. C/A+A/A	35 (37,6)	53 (29,9)	76 (42,5)	0,66 (0,44-0,97)	0,04	0,82 (0,49-1,37)	0,52	0,58 (0,37-0,90)	0,02	0,71 (0,42-1,20)	0,22
	Alelo C	149 (0,8)	296 (0,84)	271 (0,76)	referência		referência		referência		referência	
	Alelo A	37 (0,2)	58 (0,16)	87 (0,24)	0,67 (0,48-0,92)	0,02	0,77 (0,50-1,19)	0,28	0,61 (0,42-0,88)	0,01	0,79 (0,50-1,25)	0,34

*Teste de Fisher

4.9 Análise de interação dos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A com os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de neoplasias cervicais

Foram avaliadas possíveis correlações entre os polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A e os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de neoplasias cervicais, tais como história familiar de câncer, história de DST prévia, número de parceiros sexuais, tabagismo, uso de método anticoncepcional, número de gestações e partos, sexarca, menarca, cor da pele e educação formal. Esta análise foi realizada entre o grupo controle e os subgrupos de casos (LSIL e HSIL+câncer) e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer (**Anexos F, G e H**).

Não foi observada interação entre o polimorfismo *p53* PIN3 e os fatores de risco clássicos em nenhuma das análises realizadas. Entretanto, a presença do genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) modificou a prevalência de mulheres que fazem uso de métodos anticoncepcionais no subgrupo de lesão mais grave (HSIL+câncer) quando comparadas com mulheres do subgrupo LSIL ($p=0,02$, OR = 4,33; IC 95% = 1,19-15,83). Embora tenha sido observada interação do genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) com o uso de métodos anticoncepcionais na análise envolvendo o subgrupo LSIL e controles, o genótipo não modificou o risco isolado do uso de contraceptivos. O mesmo foi observado nas análises comparativas entre o subgrupo HSIL+câncer e o grupo controle, nas interações do genótipo *p53* 72CG (Pro/Arg) com o número de gestações e partos, e o uso de métodos anticoncepcionais.

A análise de interação dos genótipos correspondentes ao polimorfismo *p21* 31C>A com os fatores de risco mencionados entre os subgrupos HSIL+câncer e LSIL permitiu identificar, no grupo de lesões mais severas, menor prevalência de mulheres não fumantes (OR = 0,33; IC 95% = 0,14-0,79), que tiveram número de parceiros maior ou igual a cinco (OR = 0,28; IC 95% = 0,10-0,78), sexarca com mais de 16 anos (OR = 0,23; IC 95% = 0,09-0,60) ou com escolaridade maior que o ensino fundamental (OR = 0,33; IC 95% = 0,13-0,83) e portadoras do genótipo *p21* 31CA (Ser/Arg), o que sugere o papel modificador de risco do genótipo em questão.

Quando a análise foi feita entre o subgrupo LSIL e o grupo controle, foram observadas, no subgrupo LSIL, maior prevalência de mulheres portadoras do genótipo *p21* 31CA (Ser/Arg) com escolaridade maior que o ensino fundamental no grupo LSIL (OR = 3,31; IC 95% = 1,26-8,74).

As ORs obtidas nas análises comparativas entre o subgrupo HSIL+câncer e o grupo controle revelaram menor prevalência de pacientes portadoras do genótipo *p21 31AA* (Arg/Arg) e com número de gestações e de partos menor do que cinco (OR = 0,26; IC 95% = 0,07-0,97; OR = 0,23; IC 95% = 0,06-0,86, respectivamente) e sexarca com idade inferior a 16 anos (OR = 0,10; IC 95% = 0,01-0,79).

4.10 Análise de combinação de genótipos

A análise comparativa entre o grupo controle e o grupo e subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer considerando as combinações dos genótipos referentes aos polimorfismos *p53 PIN3* e *p53 72C>G* (Tabela 6) não revelou diferenças significativas. Quando foi feita a análise comparativa entre os grupos e subgrupos considerando as combinações de genótipos correspondentes aos polimorfismos *p53 PIN3* e *p21 31C>A* (Tabela 7) e *p53 72C>G* e *p21 31C>A* (Tabela 8), foi identificada diferença significativa entre o subgrupo HSIL+câncer e controles em relação à combinação *p53 PIN3A1/A1* e *p21 31C/A* ($p=0,018$) e entre o subgrupo LSIL e controles para a combinação *p53 72CC* e *p21 31C/A* ($p=0,049$). Essas combinações foram menos prevalentes no subgrupo de lesão, conferindo efeito protetor.

Na nossa população de estudo, não foram observadas oito das 27 possíveis combinações de genótipos referentes aos três polimorfismos (*p53 PIN3*, *p53 72C>G* e *p21 31C>A*). Na análise comparativa envolvendo os grupos e subgrupos (Tabela 9), a combinação *p53 PIN3A1/A1*, *p53 72G/G* e *p21 31C/C* foi a mais frequente nos controles e no grupo e nos subgrupos de casos, não se observando diferença na distribuição das combinações de genótipos entre os grupos.

Tabela 6: Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

Genótipos		Casos n	LSIL n	HSIL+Ca n	Controles n	Casos vs Controles	LSIL vs Controles	HSIL+câncer vs Controles	HSIL+câncer vs LSIL
<i>p53</i> PIN3	<i>p53</i> 72C>G					OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
A1/A1	G/G	94	33	61	57	Referência	Referência	Referência	Referência
A1/A1	C/G	69	27	42	50	0,84 (0,51-1,37)	0,93 (0,49-1,76)	0,78 (0,45-1,36)	0,84 (0,44-1,60)
A1/A2	C/G	44	17	27	30	0,89 (0,50-1,57)	0,98 (0,47-2,04)	0,84 (0,45-1,58)	0,86 (0,41-1,80)
A1/A2	C/C	25	7	18	15	1,01 (0,49-2,08)	0,81 (0,30-2,18)	1,12 (0,52-2,43)	1,39 (0,53-3,67)
A1/A1	C/C	19	4	15	11	1,05 (0,47-2,36)	0,63 (0,18-2,13)	1,27 (0,54-3,00)	2,03 (0,62-6,61)
A2/A2	C/C	11	3	8	7	0,95 (0,35-2,60)	0,74 (0,18-3,06)	1,07 (0,36-3,13)	1,44 (0,36-5,81)
Outras combinações*		6	2	4	2	1,82 (0,35-9,32)	1,73 (0,23-12,85)	1,87 (0,33-10,60)	1,08 (0,19-6,22)

* Outras combinações: A2/A2 – G/G; A2/A2 – C/G; A1/A2 – G/G.

Tabela 7: Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3 e *p21* 31C>A entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

Genótipos		Casos n	LSIL n	HSIL+Ca n	Controles n	Casos vs Controles	LSIL vs Controles	HSIL+câncer vs Controles	HSIL+câncer vs LSIL
<i>p53</i> PIN3	<i>p21</i> 31C>A					OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
A1/A1	C/C	121	37	84	64	Referência	Referência	Referência	Referência
A1/A1	C/A	57	26	31	47	0,64 (0,39-1,05)	0,96 (0,51-1,79)	0,50 (0,29-0,88)^a	0,53 (0,27-1,01)
A1/A2	C/C	47	17	30	31	0,80 (0,47-1,38)	0,95 (0,46-1,94)	0,74 (0,40-1,34)	0,78 (0,38-1,58)
A1/A2	C/A	22	7	15	15	0,78 (0,38-1,60)	0,81 (0,30-2,16)	0,76 (0,35-1,67)	0,94 (0,36-2,51)
A2/A2	C/C	11	3	8	5	1,16 (0,39-3,50)	1,04 (0,23-4,60)	1,22 (0,38-3,90)	1,18 (0,29-4,68)
Outras combinações		8	2	6	11	0,38 (0,15-1,01)	0,31 (0,07-1,50)	0,42 (0,15-1,18)	1,32 (0,25-6,86)

* Outras combinações: A1/A1 – A/A; A2/A2 – C/A; A2/A2 – A/A; A1/A2 – A/A.

^a $p = 0,018$

Tabela 8: Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos *p53 72C>G* e *p21 31C>A* entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

Genótipos		Casos	LSIL	HSIL+Ca	Controles	Casos vs Controles	LSIL vs Controles	HSIL+câncer vs Controles	HSIL+câncer vs LSIL
<i>p53 72C>G</i>	<i>p21 31C>A</i>	n	n	n	n	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
C/G	C/C	73	27	46	46	Referência	Referência	Referência	Referência
G/G	C/C	64	19	45	35	1,15 (0,66-2,00)	0,92 (0,44-1,93)	1,29 (0,70-2,35)	1,39 (0,68-2,85)
C/G	C/A	36	15	21	29	0,78 (0,42-1,44)	0,88 (0,40-1,93)	0,72 (0,36-1,45)	0,82 (0,36-1,86)
G/G	C/A	34	16	18	18	1,19 (0,60-2,35)	1,51 (0,66-3,45)	1,00 (0,46-2,16)	0,66 (0,29-1,51)
C/C	C/C	42	11	31	16	1,65 (0,83-3,28)	1,17 (0,47-2,89)	1,94 (0,93-4,02)	1,65 (0,72-3,82)
C/C	C/A	11	2	9	15	0,46 (0,20-1,09)	0,23 (0,05-1,07)^a	0,60 (0,24-1,51)	2,64 (0,53-13,14)
C/G	A/A	5	1	3	5	0,63 (0,17-2,30)	0,34 (0,04-3,07)	0,60 (0,14-2,66)	1,76 (0,17-17,79)
Outras combinações		5	2	3	7	0,45 (0,13-1,50)	0,49 (0,09-2,52)	0,43 (0,10-1,76)	0,88 (0,14-5,61)

* Outras combinações: G/C – A/A; C/C – A/A.

^a $p=0,049$

Tabela 9: Análise multiplicativa de genótipos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A (n=459) entre o grupo controle e o grupo e os subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer.

Genótipos			Casos n	LSIL n	HSIL+Ca n	Controles n	Casos vs Controles OR (IC 95%)	LSIL vs Controles OR (IC 95%)	HSIL+câncer vs Controles OR (IC 95%)	HSIL+câncer vs LSIL OR (IC 95%)
<i>p53</i> PIN3	<i>p53</i> 72C>G	<i>p21</i> 31C>A								
A1/A1	G/G	C/C	59	17	42	34	Referência	Referência	Referência	Referência
A1/A1	C/G	C/C	45	16	29	24	1,08 (0,56-2,07)	1,33 (0,56-3,15)	0,98 (0,48-1,98)	0,73 (0,32-1,68)
A1/A2	C/G	C/C	27	11	16	21	0,74 (0,36-1,51)	1,05 (0,41-2,67)	0,62 (0,28-1,36)	0,59 (0,23-1,53)
A1/A1	C/G	C/A	22	10	12	20	0,63 (0,30-1,33)	1,00 (0,38-2,60)	0,49 (0,21-1,13)	0,49 (0,18-1,34)
A1/A1	G/G	C/A	33	16	17	18	1,06 (0,52-2,16)	1,78 (0,73-4,33)	0,76 (0,34-1,71)	0,43 (0,18-1,04)
A1/A2	C/C	C/C	15	4	11	9	0,96 (0,38-2,43)	0,89 (0,24-3,31)	0,99 (0,37-2,66)	1,11 (0,31-3,99)
A1/A2	C/G	C/A	14	5	9	9	0,90 (0,35-2,29)	1,11 (0,32-3,84)	0,81 (0,29-2,27)	0,73 (0,21-2,49)
A1/A2	C/C	C/A	8	2	6	6	0,77 (0,25-2,40)	0,67 (0,12-3,66)	0,81 (0,24-2,74)	1,21 (0,22-6,63)
A2/A2	C/C	C/C	10	3	7	4	1,44 (0,42-4,95)	1,50 (0,30-7,48)	1,42 (0,38-5,25)	0,94 (0,22-4,09)
A1/A1	C/C	C/C	17	4	13	3	3,27 (0,89-11,96)	2,67 (0,53-13,30)	3,51 (0,92-13,33)	1,32 (0,38-4,61)
Outras combinações*			16	4	12	20	0,46 (0,21-1,01)	0,40 (0,12-1,36)	0,49 (0,21-1,13)	1,21 (0,34-4,30)

* Outras combinações: A1/A1 – C/C – C/A; A1/A1 – C/G – A/A; A1/A1 – G/G – A/A; A1/A2 – C/C – A/A; A1/A2 – C/G – A/A; A1/A2 – G/G – C/C; A2/A2 – C/C – C/A; A2/A2 – C/C – A/A; A2/A2 – C/G – C/C.

4.11 Análise multiplicativa de alelos dos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A nos grupos controle e subgrupos de casos e entre os subgrupos LSIL e HSIL+câncer

A análise da interação multiplicativa de alelos referentes aos três polimorfismos estudados não mostrou diferença quando o grupo controle foi comparado com o subgrupo LSIL (Tabela 10) e quando a comparação foi feita entre os dois subgrupos de casos (Tabela 11). Entretanto, houve diferença de distribuição das combinações alélicas entre o grupo controle e o subgrupo HSIL+câncer (Tabela 12). Os resultados obtidos revelaram que a combinação dos alelos *p53* PIN3A1 (sem a inserção de 16 pb), *p53* 72C (alelo Pro) e *p21* 31A (alelo Arg) conferiu efeito protetor para o desenvolvimento de HSIL e câncer cervical (OR bruta = 0,22, IC 95% = 0,07-0,70, $p = 0,01$). Quando realizada a análise no modelo ajustado para os fatores de risco idade, fumo, uso de método anticoncepcional, história familiar de câncer, DST, número de parceiros sexuais e etnia, esse efeito se manteve (OR ajustada = 0,26, IC 95% = 0,08-0,78, $p = 0,02$). Além disso, no modelo ajustado, os indivíduos portadores da combinação de alelos *p53* PIN3A1 (sem a inserção de 16 pb), *p53* 72C (alelo Pro) e *p21* 31C (alelo Ser) apresentaram risco de desenvolver neoplasias cervicais de alto grau e câncer (OR = 1,68; IC 95% = 1,03-2,72, $p = 0,04$). As covariáveis que se mostraram significativas foram DST (OR = 2,90; IC 95% = 1,71-4,91, $p = 0,0001$) e uso de método anticoncepcional (OR = 0,40; IC 95% = 0,22-0,72; $p=0,002$).

Tabela 10: Análise multiplicativa de alelos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A entre o grupo controle e o subgrupo LSIL.

Alelos			Controle	LSIL	OR bruta (IC 95%)
<i>p53</i> PIN3	<i>p53</i> 72C>G	<i>p21</i> 31C>A			
A1	G	C	0,4448	0,4532	Referência
A1	C	C	0,1641	0,2055	1,32 (0,74 – 2,36)
A2	C	C	0,1382	0,1290	0,92 (0,51 – 1,66)
A1	G	A	0,1198	0,1255	1,28 (0,65 – 2,54)
A1	C	A	0,0914	0,0241	0,19 (0,03 – 1,29)
A2	C	A	0,0304	0,0277	0,95 (0,30 – 2,98)
A2	G	C	0,0112	0,0136	1,17 (0,25 – 5,53)

Tabela 11: Análise multiplicativa de alelos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A entre os subgrupos de casos LSIL e HSIL+câncer

Alelos			LSIL	HSIL + câncer	OR bruta (IC 95%)
<i>p53</i> PIN3	<i>p53</i> 72C>G	<i>p21</i> 31C>A			
A1	G	C	0,4532	0,4484	Referência
A1	C	C	0,2055	0,2343	1,12 (0,68 – 1,84)
A2	C	C	0,1290	0,1396	1,06 (0,61 – 1,83)
A1	G	A	0,1255	0,1063	0,69 (0,35 – 1,36)
A1	C	A	0,0241	0,0245	1,25 (0,32 – 4,92)
A2	C	A	0,0277	0,0329	1,01 (0,15 – 6,82)
A2	G	C	0,0136	0,0139	0,97 (0,17 – 5,71)

Tabela 12: Análise multiplicativa de alelos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A entre o grupo controle e o subgrupo HSIL+câncer

Alelos			Controle	HSIL + câncer	OR bruta (IC 95%)	OR ajustada (IC 95%)*
<i>p53</i> PIN3	<i>p53</i> 72C>G	<i>p21</i> 31C>A				
A1	G	C	0,4448	0,4484	Referência	Referência
A1	C	C	0,1641	0,2343	1,47 (0,94 – 2,30)	1,68 (1,03 – 2,72)^b
A2	C	C	0,1382	0,1396	1,00 (0,63 – 1,60)	5,05 (0,48 – 53,43)
A1	G	A	0,1198	0,1063	0,94 (0,53 – 1,67)	1,01 (0,54 – 1,88)
A1	C	A	0,0914	0,0245	0,22 (0,07 – 0,70)^a	0,26 (0,08 – 0,78)^c
A2	C	A	0,0304	0,0329	0,96 (0,38 – 2,45)	0,98 (0,58 – 1,66)
A2	G	C	0,0112	0,0139	1,17 (0,30 – 4,57)	5,05 (0,47 – 3,43)

*ajustada para idade, fumo, uso de método anticoncepcional, história familiar de câncer, DST, nº de parceiros sexuais e etnia.

^a $p=0,01$; ^b $p=0,04$; ^c $p=0,02$

4.12 Análise imunohistoquímica de p53, p21, p16, ciclina D1, Ki-67, HPV-16 e HPV *pool* nas lesões cervicais

Os dois blocos de TMA contendo cilindros com tecido normal retirados da mucosa adjacente à área da lesão foram negativas para imunomarcagem para p16 e também foram consideradas negativas para os outros marcadores p53, p21, Ki-67 e ciclina D1, por apresentarem positividade focal, restrita à camada basal e parabasal em menos de 10% das células.

Dos 196 casos selecionados para a construção do TMA, 166 (84,7%) se mostraram adequados para análise imunohistoquímica, e foram classificados de acordo com o laudo histopatológico em LSIL (50 casos), HSIL (98) e câncer (16 casos de CCE e 2 casos de adenocarcinoma). O estudo imunohistoquímico para p53, p21, ciclina D1, p16 e Ki-67 foi realizado em 166, 164, 135, 161 e 143 casos, respectivamente.

A análise imunohistoquímica para p53, p21 e Ki-67 apresentou localização nuclear em todos os casos. A ciclina D1 e p16 revelaram positividade citoplasmática e nuclear. Entretanto, imunomarcagem para p16 foi sempre intensa e forte, com marcante positividade citoplasmática. Na figura 18 e na tabela 13, pode-se observar, respectivamente, os resultados da análise imunohistoquímica e os dados de positividade da expressão dos cinco marcadores de acordo com o diagnóstico histopatológico. Já nas tabelas 14 e 15, estão listadas as distribuições no epitélio da positividade e as intensidades de imunomarcagem dos biomarcadores.

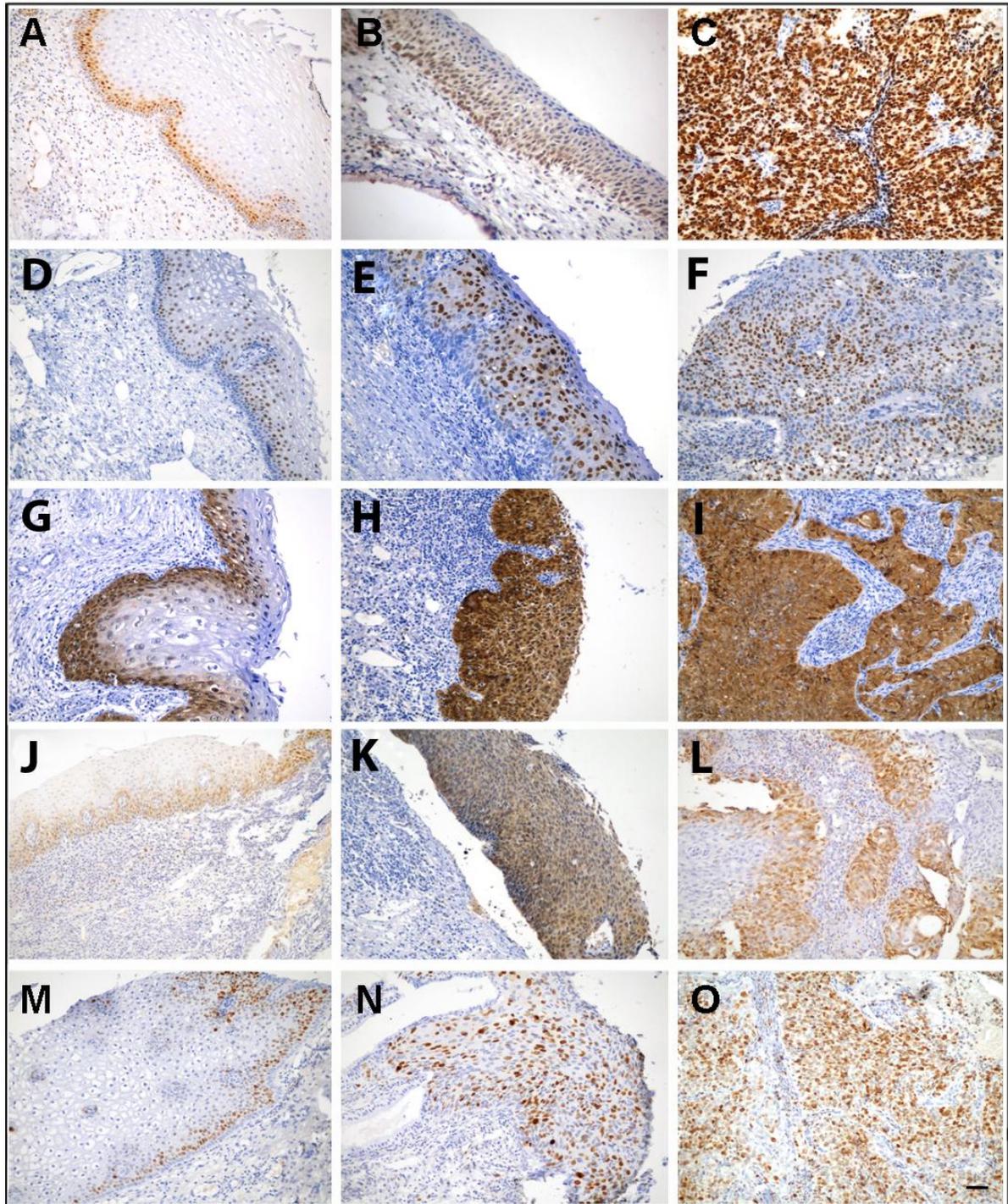


Figura 18: Análise imunohistoquímica para p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 em mucosa cervical com LSIL, HSIL e carcinoma escamoso. LSIL (A, D, G, J, M), HSIL (B, E, H, K, N) e câncer (C, F, I, L, O) e padrão de distribuição avaliado: pb+, camadas basal e parabasal; 1+, terço inferior da espessura do epitélio; 2+, dois-terços inferiores da espessura do epitélio; 3+, mais de dois-terços podendo comprometer toda a espessura do epitélio. Barra - 100 μ m. **Imunomarcção para anti-p53:** localização nuclear; distribuição pb+(A), distribuição 2+(B) e padrão difuso (C). **Imunomarcção para anti-p21:** localização nuclear; distribuição 1+ (D), distribuição 3+ (E) e padrão difuso (F). **Imunomarcção para anti-p16:** localização nuclear e citoplasmática; distribuição 1+ (G), distribuição 3+ (H) e padrão difuso (I). **Imunomarcção para anti-ciclina D1:** localização nuclear e citoplasmática; distribuição 1+ (J), distribuição 3+ (K) e padrão difuso (L). **Imunomarcção para anti-Ki-67:** localização nuclear; distribuição pb+ (M), distribuição 2+ (N) e padrão difuso (O).

Tabela 13: Análise da positividade imunohistoquímica para p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 nas lesões cervicais

Marcador/ estudo imunohistoquímico	Diagnóstico			p*
	LSIL n (%)	HSIL n (%)	Câncer n (%)	
p53				
Positivo	44 (88,0)	94 (95,9)	18 (100,0)	0,08
Negativo	6 (12,0)	4 (4,1)	0 (0)	
p21				
Positivo	40 (83,3)	93 (94,9)	18 (100,0)	0,02
Negativo	8 (16,7)	5 (5,1)	0 (0)	
p16				
Positivo	11 (24,4)	87 (88,8)	18 (100,0)	< 0,001
Negativo	34 (75,6)	11 (11,2)	0 (0)	
Ciclina D1				
Positivo	34 (91,9)	39 (47,6)	9 (56,2)	< 0,001
Negativo	3 (8,1)	43 (52,4)	7 (43,8)	
Ki67				
Positivo	39 (100,0)	86 (100,0)	18 (100,0)	-
Negativo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

** Valor de p relativo à análise comparativa dos três grupos.

Tabela 14: Análise da positividade imunohistoquímica para p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 nas lesões cervicais, em relação à distribuição epitelial

Marcador/ Distribuição epitelial*	Diagnóstico		p**
	LSIL n (%)	HSIL n (%)	
p53			
1+	20 (45,5)	24 (25,5)	< 0,001
2+	17 (38,6)	46 (49,0)	
3+	7 (15,9)	24 (25,5)	
p21			
1+	8 (20,0)	4 (4,3)	< 0,001
2+	28 (70,0)	41 (44,1)	
3+	4 (10,0)	48 (51,6)	
p16			
1+	5 (45,4)	5 (5,8)	< 0,001
2+	4 (36,4)	41 (47,1)	
3+	2 (18,2)	41 (47,1)	
Ciclina D1			
1+	31 (91,2)	31 (79,5)	< 0,001
2+	3 (8,8)	7 (17,9)	
3+	0 (0)	1 (2,6)	
Ki67			
1+	24 (61,5)	18 (21,0)	< 0,001
2+	12 (30,8)	37 (43,0)	
3+	3 (7,7)	31 (36,0)	

* 1+, terço inferior do epitélio; 2+, dois terços inferiores do epitélio; 3+, > dois terços da espessura do epitélio.

** Valor de p relativo à análise comparativa dos três grupos.

Tabela 15: Análise da positividade imunohistoquímica para p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 nas lesões cervicais, em relação à intensidade da marcação

Marcador/ Intensidade*	Diagnóstico			p**
	LSIL n (%)	HSIL n (%)	Câncer n (%)	
p53				
1+	6 (13,6)	9 (9,6)	0 (0)	0,21
2+	16 (36,4)	36 (38,3)	6 (33,3)	
3+	22 (50,0)	49 (52,1)	12 (66,7)	
p21				
1+	16 (40,0)	12 (12,9)	1 (5,6)	< 0,001
2+	11 (27,5)	20 (21,5)	4 (22,2)	
3+	13 (32,5)	61 (65,6)	13 (72,2)	
p16				
1+	3 (27,3)	6 (6,9)	1 (5,5)	< 0,001
2+	4 (36,4)	22 (25,3)	3 (16,7)	
3+	4 (36,4)	59 (67,8)	14 (77,8)	
Ciclina D1				
1+	4 (11,8)	18 (46,1)	3 (33,3)	< 0,001
2+	9 (26,4)	6 (15,4)	3 (33,3)	
3+	21 (61,8)	15 (38,5)	3 (33,3)	
Ki67				
1+	3 (7,7)	1 (1,2)	0 (0)	0,12
2+	5 (12,8)	11 (12,8)	0 (0)	
3+	31 (79,5)	74 (86,0)	18 (100)	

* 1+, intensidade fraca; 2+, intensidade moderada; 3+, intensidade acentuada.

** Valor de p relativo à análise comparativa dos três grupos.

4.12.1. Análise imunohistoquímica da expressão de p53 nas lesões cervicais

A positividade para p53 foi detectada em 88,0% dos casos de LSIL, 95,9% casos de HSIL e em todos os casos de câncer (100%) (Tabela 13 e Figuras 18A, 18B e 18C), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em relação à distribuição epitelial, a maioria dos casos de LSIL apresentou positividade restrita aos terços inferior (45,5%) e médio (38,6%) do epitélio (Tabela 14). No grupo HSIL, foi observada positividade significativamente maior no terço médio do epitélio (49,0%) quando comparada com o grupo LSIL ($p=0,03$). Todos os casos de carcinoma mostraram positividade para p53 com um padrão difuso. Não foi

identificada diferença significativa entre os três grupos quanto à intensidade da marcação para p53 ($p=0.21$) (Tabela 15).

4.12.2 Análise imunohistoquímica da expressão de p21 nas lesões cervicais

A positividade imunohistoquímica para p21 foi observada em 83.3%, 94.9% e 100% dos grupos LSIL, HSIL e câncer, respectivamente (Tabela 13 e Figuras 18D, 18E and 18F), com diferença estatisticamente significativa de expressão entre os grupos LSIL, HSIL e câncer ($p < 0,001$). A expressão de p21 nos casos de HSIL foi observada nas camadas mais superiores (95,7%) quando comparada com os casos de LSIL (80%), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) (Tabela 14). A intensidade da positividade foi maior nos grupos HSIL e câncer quando comparada com o grupo LSIL ($p < 0.001$) (Tabela 15).

4.12.3 Análise imunohistoquímica da expressão de p16 nas lesões cervicais

Foi observada superexpressão de p16 em 24.4%, 88.8% e 100% dos casos de LSIL, HSIL e câncer, respectivamente (Tabela 13 e Figuras 18G, 18H e 18I), com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Nos casos de LSIL, foi observada positividade nas camadas inferiores (45.4%) e intermediária (36.4%), enquanto no grupo HSIL foi detectada positividade preferencialmente nas camadas intermediária e superficial (94.2%), e nos casos de câncer a distribuição se mostrou difusa (Tabela 14), com diferença significativa entre os grupos ($p < 0.001$). A intensidade da expressão de p16 foi maior nos grupos HSIL e câncer quando comparada com o grupo LSIL ($p < 0.001$) (Tabela 15).

4.12.4 Análise imunohistoquímica da expressão de ciclina D1 nas lesões cervicais

Expressão aumentada de ciclina D1 foi identificada em 91.9% dos casos de LSIL, em 47.6% dos casos de HSIL e em 56.2% dos casos de câncer (Tabela 13 e Figuras 18J, 18K e 18L), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos

($p < 0.001$). A positividade de ciclina D1 foi observada principalmente nos terços inferior e intermediário do epitélio nos casos de LSIL e HSIL (100% e 97.4%, respectivamente) (Tabela 14). A intensidade da coloração foi maior no grupo LSIL quando comparada com os grupos HSIL e câncer ($p < 0.001$) (Tabela 15).

4.12.5 Análise imunohistoquímica da expressão de Ki-67 nas lesões cervicais

Positividade para Ki-67 foi observada em todos os casos (Tabela 13 e Figuras 18M, 18N e 18O). No subgrupo LSIL, a expressão de Ki-67 foi detectada predominantemente no terço inferior (61.5%), enquanto nos casos de HSIL a expressão foi observada principalmente nas camadas intermediária (43.0%) e superficial (36.0%) e no grupo câncer o padrão foi difuso (Tabela 14), com diferença significativa entre os grupos ($p < 0.001$). A maioria dos casos de LSIL e HSIL e todos os casos de câncer mostraram intensidade de marcação forte sem diferença entre os grupos ($p = 0.12$) (Tabela 15).

4.12.6 Análise imunohistoquímica para HPV-16 e HPV pool

O estudo imunohistoquímico para HPV *pool* (HPV 1, 6, 11, 16, 18 e 31) e HPV-16 revelou positividade em 96.3% e 77.5% dos casos, respectivamente (Figura 19). Nos subgrupos LSIL, HSIL e câncer foi observada positividade para HPV16 em 85,1%, 82,1% e 33% dos casos, respectivamente e a positividade para HPV pool entre os subgrupos LSIL, HSIL e câncer foi de 97,9%, 97,9% e 83,3% dos casos, respectivamente.

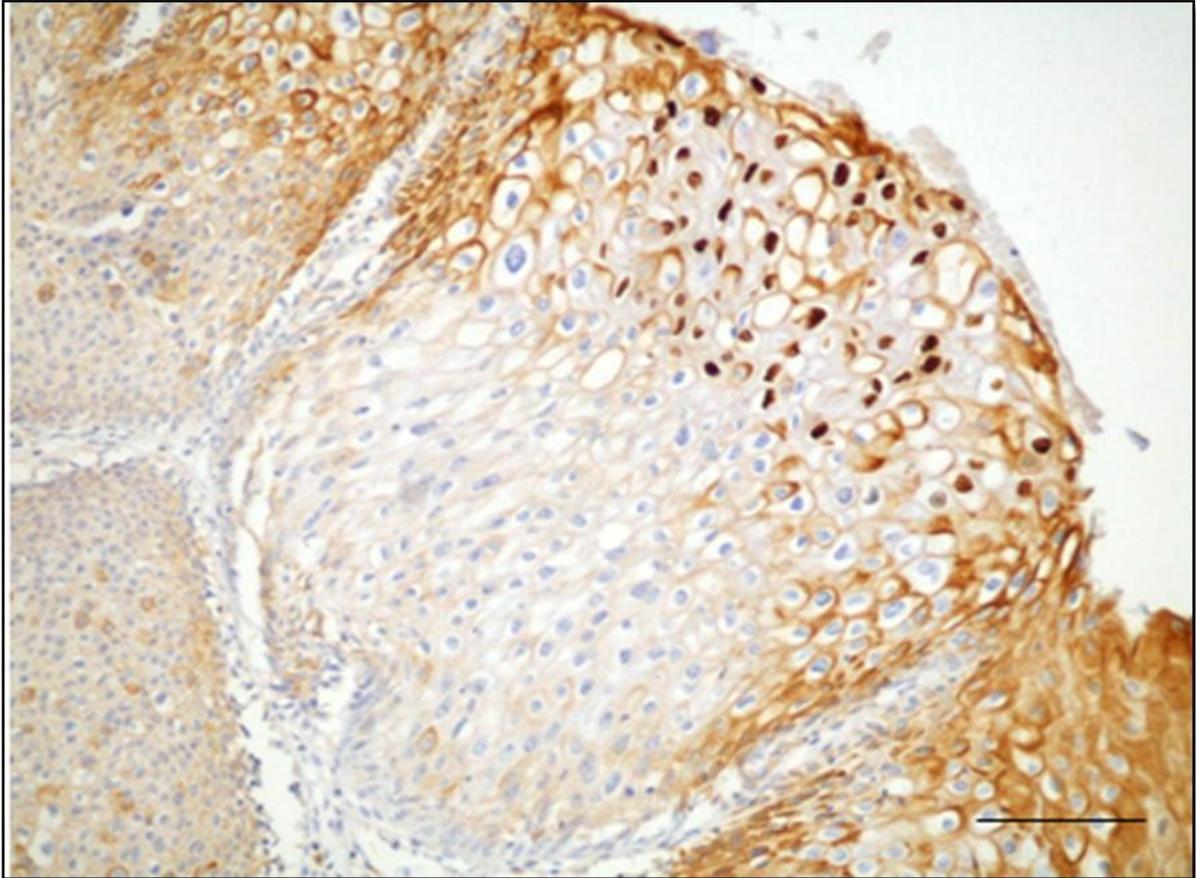


Figure 19 – Microfotografia de mucosa do colo uterino, coloração imunohistoquímica para pesquisa de anticorpos anti-HPV16 com forte positividade nuclear evidente no terço superior do epitélio escamoso. Barra – 100 μ m.

4.13 Comparação entre as expressões de p53, p21, p16, ciclina D1, Ki-67, HPV pool e HPV 16 nas lesões cervicais

A expressão de p16 se mostrou associada à expressão de p21 e ciclina D1 ($p < 0,0001$, OR=0,13; IC=0,04-0,40; $p=0,02$; OR=4,46; IC=1,19-16,69, respectivamente), e à positividade para HPV 16 ($p=0,006$, OR=0,22; IC=0,06-0,77). Foi também observada associação entre a expressão de ciclina D1 e a positividade para HPV16 ($p=0,003$, OR=4,0; IC=1,56-10,25). A expressão de p53 só se relacionou com a expressão de p21 ($p < 0,0001$; OR=21,88 IC=4,90-97,59) (Tabela 16)

Tabela 16: Relação entre a positividade de expressão imunohistoquímica de p53, p21, ciclina D1, p16, Ki-67, HPV pool e HPV-16 nas neoplasias cervicais

p53						
<0,001	p21					
0,078	0,017	p16				
0,320	0,320	<0,001	ciclina D1			
NA	NA	NA	NA	Ki-67		
0,093	0,263	0,135	0,059	NA	HPV pool	
0,679	0,221	0,011	0,003	NA	<0,001	HPV16

NA= Não se aplica

A utilização do teste de correlação de Pearson contribuiu para melhor avaliar o grau de associação entre os diferentes grupos de lesões e os biomarcadores, considerando a distribuição epitelial (Tabela 17). Foi observada correlação moderada entre o diagnóstico histopatológico das lesões cervicais com distribuição epitelial da expressão de p16 ($r=0,66$), Ki-67 ($r=0,50$), p21 ($r=0,44$) e p53 ($r=0,42$). Correlações moderadas também foram identificadas entre as distribuições epiteliais de p16 e Ki-67 ($r=0,59$), p53 e p21 ($r=0,47$), p21 e p16 ($r=0,44$) e p21 e Ki-67 ($r=0,43$).

Tabela 17: Coeficiente de correlação de Pearson entre o laudo histopatológico das neoplasias cervicais (LSIL, HSIL e câncer) e as distribuições epiteliais da expressão imunohistoquímica de p53, p21, p16, ciclina D1, Ki-67 e HPV 16.

Laudo Bx						
0,416	p53					
0,443	0,468	p21				
0,663	0,284	0,444	p16			
0,004	0,126	0,210*	- 0,129*	Ciclina D1		
0,496	0,277	0,429	0,585	0,170*	Ki-67	
- 0,455	- 0,307	- 0,270	- 0,318	0,034*	- 0,292	HPV 16

*p não significativo.

Artigo intitulado “Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16^{Ink4a}, p21^{WAF1} and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia” foi encaminhado à revista *International Journal of Gynecological Pathology* e aceito para publicação em 15 de agosto de 2012 (**ANEXO I**).

4.14 Correlação entre as expressões de p53, p21, p16, ciclina D1, Ki-67, HPV *pool* e HPV 16 no grupo de casos e nos subgrupos LSIL e HSIL+câncer e os polimorfismos nos genes *TP53* e *p21*

Embora as análises de correlação dos níveis de expressão de p53, p21 e Ki-67 e a positividade imunohistoquímica para anti-HPV *pool* com os polimorfismos p53 PIN3, p53 72C>G e p21 31C>A tenham sido prejudicadas pelo número reduzido de amostras negativas, o genótipo p53 72GG (Arg/Arg) foi menos representado nos casos negativos para p21 e foi mais prevalente nos casos negativos para anti-HPV *pool*, especialmente nos casos de lesão mais severa (Tabela 18).

Não se observou correlação entre a positividade para anti-HPV 16 e os polimorfismos estudados. Entretanto, foi observada uma tendência a maior prevalência do genótipo p53 72GG (Arg/Arg) nos casos negativos para ciclina, especialmente nas neoplasias mais severas, e a menor prevalência do genótipo p21 31CC (Ser/Ser) nos casos negativos para a expressão de p16.

Tabela 18: Correlação entre as frequências genóticas e alélicas correspondentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A e a expressão imunohistoquímica de *p53*, *p21*, *p16*, ciclina D1, Ki-67, HPV *pool* e HPV 16 no grupo e subgrupos de casos.

	Grupo ou subgrupo de casos	Genótipo ou alelo	p53			p21			p16			ciclina D1			Ki-67			HPV <i>pool</i>			HPV 16		
			-	+	<i>p</i>	-	+	<i>p</i>	-	+	<i>p</i>	-	+	<i>p</i>	-	+	<i>p</i>	-	+	<i>p</i>	-	+	<i>p</i>
<i>p53</i> PIN3	LSIL	A1/A1	2	29	0,167	4	25	0,443	19	8	0,740	3	22	--	0	26	--	1	29	--	4	26	1,000
		A1/A2+A2/A2	4	13		4	13		13	4		0	12		0	13		0	16		2	14	
	HSIL+ca	A1/A1	2	69	1,000	3	68	1,000	5	68	0,489	34	27	0,382	0	65	--	4	70	0,663	22	52	0,497
		A1/A2+A2/A2	1	37		2	36		4	34		14	17		0	33		1	36		8	29	
	Casos	A1/A1	4	98	0,279	7	93	0,55	24	76	0,350	37	49	0,340	0	91	--	5	99	0,665	26	78	0,429
		A1/A2+A2/A2	5	50		6	49		17	38		14	29		0	46		1	52		10	43	
<i>p53</i> 72C>G	LSIL	G/G	1	15	0,648	1	13	0,402	11	3	0,720	1	11	1,000	0	12	--	1	14	--	3	12	0,384
		C/G+C/C	5	26		7	24		20	9		2	22		0	26		0	30		3	27	
	HSIL+ca	G/G	1	40	1,000	0	41	--	2	42	0,479	24	13	0,061 _a	0	39	--	5	38	0,030 _b	14	29	0,391
		C/G+C/C	2	66		5	63		7	61		25	31		0	60		1	68		17	52	
	Casos	G/G	2	55	0,488	1	54	0,033 _c	13	45	0,570	25	24	0,065 _d	0	51	--	6	52	0,011 _e	17	41	0,243
		C/G+C/C	7	92		12	87		27	70		27	53		0	86		1	98		20	79	
<i>p21</i> 31C>A	LSIL	C/C	0	24	--	4	22	0,713	16	9	0,181	2	18	1,000	0	22	--	1	26	--	5	22	0,682
		C/A+A/A	3	18		4	16		16	3		1	15		0	17		0	19		2	17	
	HSIL+ca	C/C	2	76	1,000	4	74	1,000	7	73	1,000	37	32	0,648	0	72	--	4	76	1,000	23	57	0,817
		C/A+A/A	1	31		1	31		3	30		12	13		0	28		2	30		8	24	
	Casos	C/C	2	100	0,182	8	96	0,761	23	82	0,058 _f	39	60	0,446	0	94	--	5	102	1,000	28	79	0,429
		C/A+A/A	4	49		5	47		19	33		13	28		0	45		2	49		10	41	

*Teste de Fisher: ^a 2,29 (0,97-5,39); ^b 8,95 (1,01-79,47); ^c 0,13 (0,02-1,06); ^d 2,05 (0,99-4,23); ^e 11,31 (1,33-96,50); ^f 0,49 (0,23-1,01).

5 DISCUSSÃO

O câncer de colo uterino apresenta importância epidemiológica, com incidência anual de mais de 500.000 novos casos e taxa de mortalidade em torno de 50%. Mais de 85% destes casos ocorrem em países em desenvolvimento, que concentram 82% da população mundial. Além disso, nestes países, a infraestrutura na área da Saúde é deficiente e não disponibiliza, em larga escala, programas básicos de prevenção como o teste de Papanicolaou, que permite a detecção de lesões precursoras ou o câncer cervical em estágios iniciais (Jemal *et al.*, 2011).

As taxas de incidência e mortalidade de câncer cervical observadas no Brasil apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas àquelas dos países desenvolvidos (INCA, 2011). Nestes países, a redução significativa das taxas de morbimortalidade ocorreu após a implementação de programas organizados de rastreamento a partir de 1950 e 1960 (Ferlay *et al.*, 2010).

O câncer cervical é uma doença de desenvolvimento lento, associada à infecção pelo HPV, e não apresenta sintomas clínicos em suas fases iniciais. O conhecimento da história natural da doença, com a infecção persistente da cérvix uterina por HPV de alto risco oncogênico podendo evoluir para lesões escamosas ou glandulares intraepiteliais de alto grau e câncer invasivo, permite a detecção e o tratamento de lesões pré-malignas, impedindo a progressão da doença.

Atualmente, é reconhecido que o espectro de alterações histológicas causadas pela infecção por HPV caracteriza, na verdade, dois processos biológicos distintos, um deles de caráter benigno, representado morfológicamente por LSIL ou NIC 1, e outro considerado pré-maligno, representado por HSIL ou NIC 2 / NIC 3. Entretanto, apesar das lesões de alto grau serem apontadas como pré-malignas, com 30 % dos casos evoluindo para câncer invasivo em um período de tempo de cerca de 30 anos, acometendo, portanto, mulheres mais velhas (Galgano *et al.*, 2010), é também descrito que cerca de 35% dos casos de HSIL apresentam regressão completa em torno de 4 a 6 meses (Trimble *et al.*, 2010).

O programa nacional de controle do câncer cervical baseia-se na detecção precoce por meio do exame citológico de rotina (Teste de Papanicolaou) e deve estar disponibilizado para todas as mulheres que já iniciaram sua vida sexual, na faixa etária de 25 a 64 anos. A rotina recomendada é a repetição do exame citológico a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados em intervalo de um ano (INCA, 2011). As mulheres com diagnóstico alterado no exame de Papanicolaou devem ser encaminhadas à unidade secundária para confirmação diagnóstica e tratamento. Entretanto, o êxito do programa de rastreamento depende de um conjunto de ações como: educar, informar e mobilizar a sociedade civil, alcançar a meta de cobertura da população alvo, reduzindo as dificuldades de acesso aos serviços de saúde, garantindo, assim, acesso a diagnóstico, tratamento e qualidade das ações, e monitorar e gerenciar continuamente estas ações (INCA, 2011).

Ações envolvendo a prevenção primária estão relacionadas à diminuição do risco de contágio pelo HPV que ocorre por via sexual. É importante esclarecer, informar e disponibilizar o uso de preservativos durante a relação sexual. Atualmente, existem duas vacinas aprovadas e comercialmente disponíveis no Brasil que protegem contra os tipos 16 e 18 do HPV (Cervarix, GlaxoSmithKline), e contra os tipos 6, 11, 16 e 18 (Gardasil, Merck). Entretanto, cabe destacar que estas ações de prevenção primária, não substituem o rastreamento pelo exame citológico (Teste de Papanicolaou) (INCA, 2011).

5.1 Fatores de risco clássicos para neoplasias cervicais

Desde a descoberta, no início dos anos 90, de que a infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico é o principal fator de risco para o desenvolvimento das neoplasias cervicais (Bosch *et al.*, 1995), muitos estudos sobre carcinogênese cervical se concentraram nos mecanismos de progressão das neoplasias intraepiteliais para o câncer cervical, bem como nos fatores de risco que poderiam influenciar na aquisição de infecção persistente do HPV (Sousa *et al.*, 2011). Atualmente sabe-se que a infecção por HPV é necessária, porém não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical. Assim, outros fatores de risco têm sido estudados tais como: comportamento sexual, coinfeções por outros agentes

sexualmente transmissíveis, como HIV, e fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro (Moreno *et al.*, 1995; Castellsagué *et al.*, 2002; Grulich *et al.*, 2011; Vesco *et al.*, 2011; Senapathy *et al.*, 2011).

Os tradicionais fatores de risco comportamentais e sociodemográficos relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical (Bosch *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2006) foram analisados neste trabalho para efeito de comparação do grupo controle com o grupo e os subgrupos (LSIL e HSIL+câncer) de casos e entre os subgrupos de casos (Tabela 1). Quando comparado o grupo controle com o grupo total de casos, os tradicionais fatores de risco que se mostraram diferentes entre os grupos foram história familiar de câncer, história prévia de DST e uso de método contraceptivo. Mulheres caucasianas, fumantes ou ex-fumantes, com história familiar de câncer, história prévia de DST, número de parceiros sexuais maior que cinco e que fazem uso de contraceptivo oral foram observadas em maior frequência no subgrupo LSIL em comparação com os controles. Apenas duas características, história prévia de DST e uso de contraceptivo oral, foram estatisticamente diferentes entre o grupo controle e o subgrupo HSIL+câncer. Os subgrupos de casos apresentaram características semelhantes, à exceção do uso de contraceptivo oral mais usado pelas mulheres com lesão mais grave e do fato das mulheres brancas prevalecerem no subgrupo LSIL. Estes dados indicam que as mulheres do grupo de casos foram expostas de forma semelhante a fatores considerados de risco para o desenvolvimento de neoplasias cervicais. Em relação à carcinogênese cervical, os tradicionais fatores de risco comportamentais descritos na literatura são, na sua grande maioria, considerados fatores de risco para a infecção pelo HPV e a sua persistência (Roura *et al.*, 2012). Estes autores observaram que o tabagismo é um fator de risco independente, embora possa estar relacionado a outros fatores de risco comportamentais para as neoplasias cervicais. Isoladamente, o fumo possui várias substâncias químicas com potencial oncogênico, sendo considerado fator de risco para câncer de pulmão, boca, orofaringe, bexiga, alguns tipos de câncer de esôfago e fator de risco modificável para câncer gástrico e colorretal (Jemal *et al.*, 2011). Além disso, alguns estudos observaram que mulheres que fumam apresentam níveis aumentados de nicotina (40x) e de seu metabólito cotinina (4x) no muco cervical (Hellberg *et al.*, 1988) e foi também evidenciado defeito no reparo do DNA associados à carcinogênese e lesão no DNA no tecido cervical de mulheres fumantes (Melikian *et al.*, 1999). Recentemente, Trushin e colaboradores (2012)

demonstraram que células infectadas por HR-HPV apresentam níveis mais elevados de benzo[a]pireno e seus metabólitos que têm capacidade de causar danos ao DNA, quando comparadas com controles.

Considerando que todas as informações foram fornecidas pelas pacientes por meio de questionário padronizado, deve-se considerar que alguns dados podem não corresponder à realidade, visto que a interpretação das perguntas é subjetiva, como para cor da pele / etnia e para muitos dados, como idade da menarca, passado de doenças sexualmente transmissíveis e número de parceiros sexuais podem não necessariamente refletir a verdade, seja por falha de memória, falta de conhecimento ou por vergonha de expor a intimidade pessoal.

5.2 Importância de polimorfismos nos genes *TP53* e *p21* para o desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais

A maioria dos polimorfismos no gene *TP53* é representada por polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism), que podem estar localizados em regiões codificantes (éxons) e não codificantes (íntrons). O polimorfismo mais estudado é o do códon 72 do éxon 4 (*p53* 72 C>G), caracterizado pela transversão C para G, que corresponde à mudança de aminoácido prolina para arginina na proteína p53 (Olivier *et al.*, 2002). Este polimorfismo está localizado na região rica em prolina, a qual é conhecida por estar relacionada às funções de estabilidade e atividade da proteína p53 (Toledo & Wahl, 2006). Foi observada que as variantes p53Arg e p53Pro apresentaram padrão de mobilidade eletrofética distinta (Matlashewski *et al.*, 1987).

De modo geral, os dados obtidos nos diferentes estudos *in vitro* e *in vivo*, confirmaram diferenças funcionais entre as variantes polimórficas da p53, tendo a p53Arg maior capacidade de induzir apoptose, enquanto a variante p53Pro se mostra mais eficaz em promover a parada do ciclo celular (Thomas *et al.*, 1999). Além disso, a proteína E6 do HPV parece se ligar de modo mais eficiente à variante p53Arg, o que acarretaria maior capacidade de promoção da degradação via ubiquitina-proteassoma da variante p53Arg em relação à p53Pro, e poderia justificar o maior risco de pacientes portadoras do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) desenvolver neoplasia cervicais observado em alguns trabalhos (Scheffner & Whitaker, 2003).

Dumont e colaboradores (2003) observaram localização mitocondrial da proteína p53 somente em células neoplásicas e, semelhante aos estudos anteriores, maior capacidade da variante p53Arg em induzir apoptose do que a p53Pro. Os autores apontaram como possível mecanismo para essa diferença funcional, o fato da p53 Arg apresentar maior capacidade de ligação e ubiquitinação pela MDM-2 com consequente exportação nuclear dessa variante para o citosol, facilitando, desse modo, a sua localização mitocondrial e subsequente indução da apoptose.

Dentre os polimorfismos intrônicos do gene *TP53*, o polimorfismo do íntron 3 (*p53* PIN3), representado pela duplicação de 16 pb, e sua associação com a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como câncer de mama, colorretal e pulmão, tem sido amplamente investigada (Hu *et al.*, 2010). A proximidade do polimorfismo *p53* PIN3 com o polimorfismo *p53* 72C>G poderia explicar parcialmente a associação proposta do alelo com a duplicação de 16 pares de bases no íntron 3 (alelo A2) com a predisposição ao câncer. A partir da suposição de que a variante do íntron 3 com 16 pb poderia influenciar o *splicing* alternativo, Gemignani e colaboradores (2004) observaram a associação do alelo A2 com níveis mais baixos de transcritos do gene *TP53*, sugerindo que este polimorfismo pode interferir no processamento de mRNA. Outros autores demonstraram que o alelo A2 estava associado com menor capacidade de apoptose e de reparo do DNA em cultura de células linfoblástóides (Wu *et al.*, 2002).

Mediante danos no DNA, o gene *TP53* ativa a transcrição do gene supressor de tumor *p21^(WAF1)*, que têm capacidade de parar o ciclo celular, impedindo temporariamente a proliferação e permitindo a correção do dano. Devido a sua importante função no controle do ciclo celular, inibindo-o por meio da inativação de complexos ciclina-CDK, alterações na sua função ou expressão têm sido relatadas na origem ou progressão das neoplasias malignas em humanos (Abbas & Dutta, 2009). O polimorfismo do códon 31 do gene *p21* (*p21* 31C>A) resulta em uma mudança de aminoácidos na proteína p21 de serina para arginina em uma região gênica altamente conservada (Chedid *et al.*, 1994). Estudos em que foi avaliada a função das variantes p21Ser e p21Arg sugeriram que ambas apresentam atividades semelhantes como inibidores de CDKs e na supressão de crescimento (Chedid *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1999). Entretanto, Su e colaboradores (2003) relataram que indivíduos que carregam pelo menos um alelo *p21* 31A (Arg) têm níveis menores do mRNA (Su *et al.*, 2003).

Para uma melhor avaliação da importância dos polimorfismos genéticos, a análise de haplótipos fornece informações mais consistentes do que a estudo isolado de um polimorfismo, visto que a análise integrada de um maior número de variações genéticas comuns confere maior poder estatístico (Pietsch *et al.*, 2006). Sabe-se que a via de resposta aos estímulos de estresse do gene *TP53* envolve diretamente o gene *p21*, bem como, genes relacionados à regulação e mediação do gene *TP53*, incluindo *MDM2*, *MDM4*, *casp8*, *TP73*, entre outros, que contém vários polimorfismos já identificados. Assim, a análise conjunta desses polimorfismos poderia fundamentar a herança genética funcional e identificar populações de pacientes com capacidades distintas de resposta aos danos celulares, tais como indivíduos com maior risco para desenvolver neoplasias, aqueles com pior prognóstico e os com resposta alterada aos tratamentos. A identificação de padrões de associação de polimorfismos funcionais geneticamente herdados relacionados à via de sinalização da p53 poderia auxiliar, portanto, uma melhor conduta clínica em relação aos pacientes geneticamente de risco (Pietsch *et al.*, 2006; Grochola *et al.*, 2010).

Os vários estudos sobre possíveis associações entre polimorfismos nos genes *TP53* e *p21* e as neoplasias cervicais mostram resultados divergentes. Considerando ainda os poucos trabalhos relatados na população brasileira, este estudo foi realizado para avaliar a importância dos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A como fatores de risco ou modificadores do risco atribuído a diversas variáveis para as neoplasias cervicais.

5.2.1 Estudo de associação entre o polimorfismo *p53* 72C>G e as neoplasias cervicais

Com relação ao polimorfismo *p53* 72C>G, Storey e colaboradores (1998) observaram um risco aumentado em cerca de seis vezes de pacientes portadoras do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) desenvolverem câncer cervical, o que poderia ser explicado pela maior sensibilidade da p53Arg em ser degradada pela oncoproteína E6. Este trabalho tem sido alvo de críticas pelo número reduzido de casos (41 controles e 30 casos de carcinoma escamoso do colo uterino), que provavelmente não são representativos da população inglesa, por apresentar resultados com intervalo de confiança amplo e pelo fato do material genético ter sido obtido de

amostras de tecido (blocos de parafina) com câncer e colo uterino normal (Souza *et al.*, 2007). Apesar das críticas, desde então o genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) tem sido extensivamente estudado, visando confirmar seu papel como potencial marcador de suscetibilidade para desenvolvimento de neoplasias de colo uterino.

Nos vários estudos subsequentes, realizados com populações de vários países em todo o mundo, foram obtidos resultados conflitantes e divergentes e, em nenhum deles, foi possível identificar um risco semelhante ao relatado por Storey e colaboradores (1998) (Souza *et al.*, 2007). Curiosamente, estudos realizados na Costa Rica, China e Índia revelaram maior risco de mulheres com genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) desenvolverem neoplasias cervicais (Bhattacharya *et al.*, 2002; Koshiol *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010), enquanto alguns autores evidenciaram maior frequência do genótipo *p53* 72CG (Pro/Arg) no grupo das mulheres com câncer (Kim *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2008; Ferreira da Silva *et al.*, 2010). A associação entre o polimorfismo *p53* 72C>G e as neoplasias cervicais não pôde ser evidenciada em diversos trabalhos descritos na literatura (Klug *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005; Nunobiki *et al.*, 2011).

A diversidade de resultados obtidos nos vários estudos com a finalidade de avaliar a importância do polimorfismo *p53* 72C>G para o desenvolvimento das neoplasias de colo uterino pode ser explicada pelas diferenças metodológicas observadas entre os mesmos. Dentre elas, destacam-se o desenho epidemiológico de estudo, os critérios de seleção de pacientes e do grupo controle, a confirmação do grupo controle estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o tamanho amostral, a fonte de DNA para determinação do polimorfismo, os métodos para genotipagem e o grupo étnico estudado (Souza *et al.*, 2007; Klug *et al.*, 2009; Francisco *et al.*, 2011). Essas considerações se aplicam ao estudo de polimorfismos genéticos, em geral.

O grupo controle, por exemplo, deve ser representativo da população da qual os grupos casos foram selecionados. Se ele não obedece ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente a distribuição genotípica observada não corresponde ao da população em geral e, nesse caso, as conclusões têm valor limitado. Entretanto, a não obediência ao princípio de Hardy-Weinberg não necessariamente implica em erros metodológicos ou de amostragem, devendo ser considerada a possibilidade da interferência de processos de migração ou seleção agindo na população em questão (Koushik *et al.*, 2004).

Makni e colaboradores (2000) mencionaram a importância dos métodos empregados nos diferentes estudos, enfatizando que eles podem interferir na genotipagem correta dos polimorfismos. Os autores observaram diferença importante nos resultados da genotipagem do polimorfismo *p53 72C>G* realizada por três laboratórios diferentes, com coeficiente de Kappa variando entre 0,49 a 0,63.

Outro fator determinante é o tamanho amostral, que quando pequeno tem força de associação insuficiente e o acaso pode influenciar as conclusões. O material utilizado para obtenção do DNA para determinação do genótipo também se mostra importante. Visto que a perda de heterozigose é um evento frequente nas células tumorais e também já foi observado nas células cervicais esfoliadas, a análise do DNA a partir de materiais provenientes de blocos de parafina, tecido tumoral congelado e células cervicais pode fornecer resultados não confiáveis, devendo-se dar preferência ao DNA extraído de amostras de sangue periférico (Klug *et al.*, 2009).

A etnia é um fator de extrema importância na suscetibilidade atribuída ao polimorfismo *p53 72C>G* e está relacionada à exposição a diferentes fatores de risco associados ao estilo de vida de cada grupo étnico. A diversidade da frequência alélica observada entre os grupos controles dos vários estudos indica que existe variação no risco entre os diferentes grupos étnicos, dependendo da prevalência do alelo *p53 72C* (Pro). A maioria dos estudos em que a associação entre o alelo *p53 72G* (Arg) e o câncer cervical foi observada incluiu populações caucasianas, nas quais a frequência desse alelo é maior do que em outras etnias (Klug *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que a associação entre o polimorfismo *p53 72C>G* e o desenvolvimento de câncer possa ser modulado por interações gene-gene e gene-ambiente que são diferentes dentro dos grupos étnicos (Francisco *et al.*, 2011).

Nossa população de estudo foi constituída por 466 indivíduos e o material genômico empregado nas análises moleculares foi obtido a partir de amostras de sangue periférico. A genotipagem do polimorfismo *p53 72C>G* foi feita pela técnica de PCR-RFLP. Todos os casos foram vistos por dois investigadores. Parte das amostras foi reanalisada e a técnica de sequenciamento foi empregada para confirmação dos genótipos.

Em nosso estudo, o grupo controle obedeceu ao princípio de Hardy-Weinberg com respeito ao polimorfismo *p53 72C>G*. Não foram encontradas diferenças

significativas nas distribuições genotípicas e alélicas entre o grupo controle e o grupo ou os subgrupos de casos (LSIL e HSIL+câncer) e entre os subgrupos de casos (Tabela 4), o que indica a ausência de associação entre o polimorfismo *p53 72C>G* e as neoplasias cervicais. Estes achados são semelhantes àqueles observados em diversos trabalhos em populações variadas (Coréia, Japão e China, alguns países da Europa, incluindo a Itália, França, Alemanha, Portugal e Inglaterra, além das Américas do Norte e Sul), em que não foi identificada associação entre o genótipo *p53 72GG* (Arg/Arg) e aumento do risco para câncer cervical (Rosenthal *et al.*, 1998; Giannoudis *et al.*, 1999; Klaes *et al.*, 1999; Ngan *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Madeleine *et al.*, 2000; Humbey *et al.*, 2002; Klug *et al.*, 2001; Abba *et al.*, 2003; Comar *et al.*, 2004; Anschau *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Nunobiki *et al.*, 2011).

Nos nossos grupos de estudo, o alelo *p53 72G* (Arg) foi o mais frequente (cerca de 0,60), com maior prevalência do genótipo *p53 72CG* (Pro/Arg), seguido dos genótipos *p53 72GG* (Arg/Arg) e *p53 72CC* (Pro/Pro). Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Silva RE e colaboradores (2009) realizado em uma população da região Centro-Oeste (Goiânia). Esses valores são intermediários em relação àqueles descritos para populações caucasianas, nas quais há predomínio do alelo *p53 72G* (Arg), e africanas, que apresentam elevada prevalência do alelo *p53 72C* (Pro). Isto pode ser explicado pelo fato da nossa população de estudo ser representada, em sua maioria, por mulheres residentes na cidade do Rio de Janeiro, com marcante variação étnica. Segundo os dados obtidos através dos questionários, nossos grupos de estudo foram compostos por mulheres mulatas, brancas e negras, espelhando provavelmente a intensa miscigenação que ocorreu ao longo dos anos, o que culminou em uma população com elevada heterogeneidade, característica do nosso país e, em particular, do estado do Rio de Janeiro. Na história do Brasil, a ocorrência de miscigenação é bastante pronunciada e atualmente a nossa população é marcadamente mestiça na aparência e na cultura. A estrutura genética da população brasileira é variada com o entrecruzamento de portugueses, índios e africanos, além da importante contribuição dos imigrantes europeus e asiáticos. Outros estudos brasileiros envolvendo o polimorfismo *p53 72C>G* realizados em populações das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, observaram frequências do genótipo *p53 72GG* (Arg/Arg) em torno de 40 a 50% e frequências do genótipo *p53 72CC* (Pro/Pro) em torno de 10% (Drummond *et al.*, 2002; Cortezzi *et*

al., 2004; Smith MA *et al.*, 2007; Honma *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008, Thurow *et al.*, 2011).

Existem poucos trabalhos descritos na literatura correlacionando o polimorfismo *p53* 72C>G com neoplasia cervical em população brasileira. Brenna e colaboradores (2004) realizaram um trabalho em que foram selecionadas 148 mulheres provenientes das cidades de São Paulo e Campinas. Foi utilizado apenas material obtido de blocos de parafina de tecido tumoral referentes a pacientes com câncer cervical em diferentes estágios da doença (27% no estágio I, 33% no estágio II e 40% no estágio III). Não houve diferença na distribuição genotípica entre os diferentes estágios clínicos da doença, sugerindo que este polimorfismo não é fator determinante na progressão da doença. Inesperadamente, nenhuma amostra foi classificada como homozigota *p53* 72CC (Pro/Pro). Apesar desse genótipo ser o mais raro na nossa população, sua identificação seria esperada, considerando o tamanho amostral.

Em outros dois estudos brasileiros envolvendo pacientes com e sem câncer cervical, realizados nas regiões sul (Porto Alegre) (Anschau *et al.*, 2005) e Nordeste (Natal) (Fernandes *et al.*, 2008), não se observou diferença significativa entre as proporções de cada genótipo nos grupos de casos e controles. No entanto, uma maior frequência do genótipo *p53* 72CG (Pro/Arg) foi observada entre as pacientes nordestinas com câncer cervical positivas para HPV 16/18, quando comparadas com o grupo controle e tendo como referência o genótipo mais raro *p53* 72CC (Pro/Pro), com risco de 5,82 ($p=0,024$). Resultados similares foram obtidos em um estudo envolvendo uma população do Rio de Janeiro composta por 304 mulheres, em que o genótipo heterozigoto *p53* 72 CG (Pro/Arg), considerando o genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) como referência, também apresentou maior prevalência no grupo de pacientes HSIL/câncer (OR=1,92; IC 95%=1,04-6,09) (Ferreira da Silva *et al.*, 2010). Os autores também apontaram sexo precoce (< 16 anos), múltiplos parceiros sexuais e ser fumante ou ex-fumante como fatores de risco independentes para o desenvolvimento de HSIL/câncer cervical.

Como já mencionado, no nosso trabalho foi observada elevada frequência do genótipo heterozigoto *p53* 72CG (Pro/Arg) nos grupos de casos e controle, sem diferença significativa entre eles. Entretanto, quando os genótipos foram analisados em combinação com os fatores de risco tradicionais, observamos maior chance das pacientes *p53* 72CC (Pro/Pro) que faziam uso de anticoncepcional oral fazerem

parte do grupo HSIL+câncer quando comparado com o grupo LSIL (OR=4,33; IC 95%=1,19-15,83). Entretanto, mulheres com o genótipo *p53* 72CG (Pro/Arg), que tiveram menos de cinco gestações, menos de cinco partos e usaram anticoncepcional apresentaram menor chance de pertencer ao grupo HSIL+câncer quando comparado com o grupo controle. Esses dados sugerem a importância desse polimorfismo tanto para o desenvolvimento das neoplasias cervicais, quanto para a progressão / severidade da doença.

O estudo de Lee JE e colaboradores (2004) revelou que pacientes coreanas portadoras do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) associado ao genótipo *p21* 31CC (Ser/Ser) e com mais de três filhos tinham risco aumentado em 6,4 para desenvolver câncer cervical. Os autores observaram ainda que o nível de educação, idade da primeira relação sexual e número de filhos eram fatores de risco independentes na carcinogênese cervical.

Associação entre polimorfismos do gene *TP53* com infecção por HPV e desenvolvimento de câncer cervical também mostra resultados divergentes. O risco de mulheres com genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) de desenvolver neoplasias cervicais se mostrou somente em associação com a infecção por HPV 16 e/ou 18 (Nagpal *et al.*, 2002; Min-min *et al.*, 2004; Piña-Sanchez *et al.*, 2011), ou aumentado em presença da infecção por HPV 16 e/ou 18 (Mittra *et al.*, 2005; Ciotti *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010). Estes achados reforçam a idéia de que pacientes homozigotas para o alelo *p53* 72G (Arg) têm maior chance de adquirir infecção do tipo persistente quando infectadas por HPV de alto risco oncogênico e, conseqüentemente, tem maior propensão de desenvolver lesões mais graves e pior sobrevida (Piña-Sanchez *et al.*, 2011). Entretanto, alguns estudos revelaram aumento do risco de pacientes portadoras do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) desenvolverem câncer cervical independente da infecção por HPV (Andersson *et al.*, 2001; Pegoraro *et al.*, 2002).

Mittra e colaboradores (2005) relataram maior prevalência do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) nas pacientes com câncer cervical em estágio mais avançado (III e IV) (OR=4,15; IC 95%=1,42-12,2). Entretanto, outros trabalhos não observaram correlação entre o polimorfismo *p53* 72C>G com fatores prognósticos como tipo e grau histológico, tamanho do tumor e presença de metástase linfonodal (Hernádi *et al.*, 2003; Brenna *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2010). O comportamento biológico do carcinoma de células escamosas do colo uterino é caracterizado por uma longa história natural, caráter infiltrativo local e desenvolvimento tardio de metástases.

Deste modo, uma conclusão definitiva sobre uma possível influência deste polimorfismo no prognóstico do câncer cervical depende de estudos de seguimento com longo período de análise da evolução clínica e sobrevida das pacientes (Jiang *et al.*, 2010).

Os estudos de meta-análise, em geral, não confirmaram a associação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e o câncer cervical (Jee *et al.*, 2004; Koushik *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007; Klug *et al.*, 2009) e a grande divergência entre os resultados dos diversos trabalhos indicam que a qualidade do estudo é fundamental para que os resultados não sejam influenciados por viés metodológico.

A meta-análise de Jee e colaboradores (2004), que reuniu 70 trabalhos publicados entre 1998 e 2002 oriundos dos vários continentes (Europa = 36; Ásia = 19; América do Norte = 6; América do Sul = 5 e África = 4), verificou maior prevalência do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) somente nos casos de adenocarcinoma do colo uterino (OR = 1,7; IC 95% = 1,1-2,6). Já a meta-análise de Souza e colaboradores (2007) incluiu somente estudos realizados com a população europeia. Os autores relataram diferenças nas frequências genótípicas para o polimorfismo *p53* 72C>G apenas nas populações dos países com maior latitude, onde se observou predomínio do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) em comparação com as populações dos países mais próximos da linha do Equador, que mostraram maior prevalência do genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro). Os autores concluíram que apesar do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) não representar risco aparente para o desenvolvimento do câncer cervical na maioria dos países europeus, em países com baixos níveis de incidência de câncer de colo do útero, como Suécia e Grécia, este genótipo poderia ser considerado um marcador genético significativo.

No estudo de Klug e colaboradores (2009), que revisaram 49 trabalhos realizados antes de 2007 em todo o mundo, ao se restringir a análise a seis estudos epidemiológicos em que uma metodologia rigorosa foi empregada representada por controles em equilíbrio de Hardy-Weinberg e a amostra de DNA para genotipagem foi obtida de células sangue, não foi observada associação entre o polimorfismo *p53* 72C>G e o câncer cervical, mesmo considerando os diferentes grupos étnicos.

Uma meta-análise mais recente foi feita visando avaliar possíveis associações do polimorfismo *p53* 72C>G com o risco para vários tipos de neoplasias malignas. Especificamente em relação ao carcinoma cervical, apesar do número elevado de trabalhos (n=65), quando os autores excluíram os trabalhos com número reduzido de

indivíduos, não foi observada associação entre esse polimorfismo e o câncer cervical (Francisco *et al.*, 2011).

Nesses estudos de meta-análise, os autores concordam que a heterogeneidade observada nos diversos trabalhos associada a erros metodológicos poderiam influenciar a interpretação dos dados e enfatizam a necessidade de mais trabalhos que apliquem metodologia rigorosa com tamanho amostral significativo. Na tabela 13 são apresentados alguns dos trabalhos envolvendo o polimorfismo *p53* 72C>G e neoplasias cervicais, demonstrando a grande heterogeneidade em relação ao tamanho amostral, país em que foi realizado, grupo étnico, material usado para determinação do genótipo e se os controles estavam ou não em equilíbrio.

Tabela 19: Dados de diferentes publicações referentes a estudo de associação entre o polimorfismo *p53* 72C>G e neoplasias cervicais. Informações sobre país e etnia, material usado para genotipagem, tamanho amostral, e se grupo controle se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

País/etnia	Material usado para genotipagem*	Caso/ controle	Controles em EHW	Autor
Noruega /Branca	Sangue	169 / 225	Sim	Helland <i>et al.</i> , 1998
Suécia / Branca	Células cervicais	551 / 621	Não	Josefsson <i>et al.</i> 1998
Inglaterra / Branca	Tecido tumoral	50 / 246	Sim	Rosenthal <i>et al.</i> , 1998.
Inglaterra / Branca	Tecido tumoral	279 / 30	Sim	Giannoudis <i>et al.</i> , 1999
Alemanha / Branca	Misto (TT e CC)	58 / 156	Sim	Klaes <i>et al.</i> , 1999
China /Amarela	Tecido tumoral	102 / 0	-	Ngan <i>et al.</i> , 1999
Grécia / Branca	Misto (TT e CC)	58 / 30	Sim	Agorastos <i>et al.</i> , 2000
EUA / Branca	Sangue	111 / 164	Sim	Madeleine <i>et al.</i> , 2000
Itália / Branca	Misto (TT e CC)	101 / 140	Sim	Tenti <i>et al.</i> , 2000
Coréia / Amarela	Misto (sangue e TT)	234 / 100	Sim	Kim <i>et al.</i> , 2001
Peru / mista	Sangue	119 / 127	Sim	Klug <i>et al.</i> , 2001
Itália / Bbranca	Tecido tumoral	111 / 0	-	Zehbe <i>et al.</i> , 2001
Índia / amarela	Misto (TT e CC)	93 / 201	Sim	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2002
França / Branca	Células cervicais	88 / 50	Não	Humbey <i>et al.</i> , 2002
Argentina/ hispânica	Tecido tumoral	235 / 79	Sim	Abba <i>et al.</i> , 2003
Coréia / Amarela	Sangue	741 / 724	Sim	Jee <i>et al.</i> , 2003
Brasil - Sudeste / mista	Tecido tumoral	148 / 0	-	Brenna <i>et al.</i> , 2004
Ilha Formosa/ Amarela	Sangue	99 / 193	Sim	Wu <i>et al.</i> , 2004
Brasil – Sul / mista	Células cervicais	82 / 73	-	Anschau <i>et al.</i> , 2005
Índia / Amarela	Sangue	61 / 94	Sim	Mitra <i>et al.</i> , 2005
Japão / Amarela	Células cervicais	144 / 54	Sim	Ueda <i>et al.</i> , 2005
México / hispânica	Células cervicais	29 / 367	Não	Haws <i>et al.</i> , 2005
Japão / Amarela	Sangue	79 / 95	Não	Ueda <i>et al.</i> , 2006
Portugal / Branca	Sangue	371 / 188	Sim	Santos <i>et al.</i> , 2006
Brasil – Sudeste / mista	Sangue	234 / 70	Sim	Ferreira da Silva <i>et al.</i> , 2010
Brasil - Sudeste / mista	Sangue	281 / 185	Sim	Este estudo

*TT: Tecido tumoral; CC: Células cervicais

5.2.2 Estudo de associação entre o polimorfismo *p53* 72PIN3 e as neoplasias cervicais

Acreditava-se, inicialmente, que os íntrons eram sequências de nucleotídeos sem qualquer função por representarem regiões não codificantes. Entretanto, atualmente inúmeras funções são atribuídas a estas sequências, incluindo a regulação da expressão gênica e a organização do genoma (Chorey & Carmel, 2012).

Os polimorfismos intrônicos tem sido amplamente investigados em estudos populacionais de associação com a suscetibilidade a vários tipos de câncer, mas os resultados ainda são inconsistentes. Com relação ao polimorfismo *p53* PIN3, alguns estudos observaram correlação entre o alelo *p53* PIN3 A2 (com a inserção de 16 pb) e o aumento do risco para câncer de mama (Wang-Gohrke *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011), câncer de esôfago e gástrico (Malik *et al.*, 2011), colorretal (Gemignani *et al.*, 2004) e pulmão (Wu *et al.*, 2002), enquanto outros trabalhos não demonstraram associação (Mitra *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007).

Apesar do efeito biológico do alelo *p53* PIN3 A2 (com a inserção de 16 pb) ainda ser desconhecido, teoricamente, poderia acarretar em erros de *splicing*, resultando em um mRNA que poderia ser traduzido em uma proteína p53 com função alterada (Costa *et al.*, 2008). Além disso, a proximidade do polimorfismo *p53* PIN3 (situado no íntron 3) com o polimorfismo *p53* 72C>G (localizado no éxon 4) poderia explicar, em parte, a possível associação do alelo *p53* PIN3 A2 com a predisposição ao câncer.

O estudo de Gemignani e colaboradores (2004) revelou uma correlação da presença do alelo *p53* PIN3 A2 com níveis reduzidos de mRNA em células linfoblastóides. Em outro estudo, também com células linfoblastóides, foi demonstrada associação entre um haplótipo de *TP53*, representado pelos alelos comuns *p53* PIN3 A1, *p53* 72C (Pro) e o alelo G do polimorfismo no íntron 6, e a maior capacidade de reparo do DNA e apoptose da proteína p53. Esta correlação foi diminuindo gradativamente quanto maior o número de alelos raros representados no haplótipo, sendo que as menores taxas foram observadas em células que continham as combinações dos genótipos homocigotos raros relativos aos três polimorfismos analisados (Wu *et al.*, 2002). Estes experimentos sugerem, então, que o polimorfismo *p53* PIN3, isolado ou em combinação com outros polimorfismos, pode

comprometer a função da proteína p53 e refletir em um aumento de suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer.

A maioria dos trabalhos sobre o polimorfismo *p53* PIN3 foi realizada em populações caucasianas e, em geral, a frequência do alelo *p53* PIN3 A2 (com a inserção de 16 pb) variou entre 10% (Espanha) e 23% (Turquia) (Hu *et al.*, 2010). A frequência do alelo *p53* PIN3 A2 em nosso estudo foi muito semelhante entre os grupos controle (18%) e os subgrupos LSIL (17%) e HSIL+câncer (19%) e está em acordo com os dados descritos na literatura (Hu *et al.*, 2010).

Estudos correlacionando neoplasias de colo uterino e o polimorfismo *p53* PIN3 isoladamente ou em conjunto com outros polimorfismos são escassos. Os nossos achados estão de acordo com os trabalhos descritos na literatura, nos quais a associação desse polimorfismo com as neoplasias cervicais não foi demonstrada (Tabela 3). Também não observamos interação entre o polimorfismo *p53* PIN3 e fatores de risco clássicos em nenhuma das análises realizadas.

Um estudo de polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G e outros polimorfismos dos genes *GST* e *CYP*, na população coreana, também não revelou correlação entre o polimorfismo *p53* PIN3 e o câncer cervical, seja isoladamente ou em associação com os outros polimorfismos investigados (Kim *et al.*, 2000). Já no estudo de Mitra e colaboradores (2005), realizado em mulheres indianas portadoras de neoplasia cervical, em que foram avaliados os polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G e do íntron 6 do gene *TP53*, só foi evidenciada diferença na distribuição genotípica entre os grupos para o polimorfismo *p53* 72C>G ($p = 0,038$). Apesar de não ter sido identificada diferença em relação aos polimorfismos intrônicos e de não ter sido identificado um haplótipo específico que conferisse aumento de risco significativo, o genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) representou risco para o desenvolvimento de câncer cervical isoladamente ou em combinação com os polimorfismos intrônicos. Estudo semelhante em mulheres brasileiras, no qual foram avaliados três polimorfismos do gene *TP53* (íntron 2, *p53* PIN 3 e *p53* 72C>G), não revelou associação entre o polimorfismo *p53* PIN 3 e o desenvolvimento de câncer do colo uterino (Fernandes *et al.*, 2008).

Na meta-análise de Hu e colaboradores (2010), que revisaram 26 trabalhos sobre correlações do polimorfismo *p53* PIN3 com vários tipos de câncer, foi identificada associação entre o alelo *p53* PIN3 A2 (com a inserção de 16 pb) e

aumento do risco de câncer em geral (OR = 1,14, IC 95% = 1,02-1,27, $p = 0,02$) e, em especial, para o câncer de mama (OR = 1,81, IC 95% = 1,30-2,56, $p < 0,001$).

Nenhum dos trabalhos acima expostos, incluindo o nosso, revelou associação isolada entre o polimorfismo *p53* PIN 3 com neoplasias cervicais, o que sugere que seja pouco provável que este polimorfismo tenha influência no desenvolvimento das neoplasias cervicais, apesar da sua aparente associação com outros tipos de câncer, principalmente de mama, pulmão e colorretal (Hu *et al.*, 2010).

5.2.3 Estudo de associação entre o polimorfismo *p21* 31C>A e as neoplasias cervicais

O gene supressor de tumor *p21* codifica um inibidor de complexos ciclina-CDK, sendo regulado diretamente pelo gene *TP53*. É considerado um dos mais potentes efetores da ação da *p53* no controle do ciclo celular e representa o principal marcador da atividade funcional da *p53* (Abbas & Dutta, 2009). Considerando a importância da proteína *p21* na via da *p53*, alterações genéticas do gene *p21* poderiam estar associadas com modificação do risco ou prognóstico de câncer. Um dos polimorfismos funcionais mais estudados desse gene é o *p21* 31C>A, que causa, na proteína, a substituição de serina por arginina em uma região altamente conservada que engloba o sítio de ligação a CDKs (Pietsch *et al.*, 2006). Foi demonstrado que as variantes da *p21* apresentam atividades funcionais semelhantes, porém, foi observado que indivíduos portadores do alelo *p21* 31A (Arg) têm diminuição na expressão de mRNA em 38% quando comparados com indivíduos homocigotos *p21* 31CC (Ser/Ser). Além disso, indivíduos portadores da combinação de genótipos *p53* 72CG e *p21* 31CA apresentaram redução de 48% da expressão de mRNA (Su *et al.*, 2003).

De modo semelhante ao que tem sido observado para o polimorfismo do éxon 4 do gene *TP53*, existe grande variabilidade na frequência alélica referente ao polimorfismo *p21* 31C>A, notando-se baixa prevalência do alelo *p21* 31A (Arg) em caucasianos (4% na Suécia), intermediária nos negros africanos e elevada nos chineses (50%) (Birgander *et al.*, 1996). Na nossa população, foram observados valores intermediários da frequência do alelo A que variou entre 20% no grupo LSIL, 16% no grupo HSIL e 24% no grupo controle (Tabela 5). Estes valores estão em

acordo com outros estudos brasileiros que revelaram frequência do alelo A em torno de 15% (Gomes *et al.*, 2008; Valentin *et al.*, 2009) e são semelhantes à frequência observada na população dos Estados Unidos (14%) (Chedid *et al.*, 1994). Este valor intermediário entre os observados em populações caucasianas (4%) e negros africanos (29%) (Valentin *et al.*, 2009) é, provavelmente, reflexo da miscigenação de nossa população.

Neste trabalho, foi observada diferença nas distribuições genóticas e alélicas para o polimorfismo *p21 31C>A* entre o grupo controle e o grupo de casos, em que foi evidenciado que os indivíduos portadores do genótipo *p21 31A/A* (Arg/Arg) (OR = 0,36; IC 95% = 0,14-0,96; $p = 0,04$) e do alelo *p21 31A* (Arg) (OR = 0,67; IC 95% = 0,48-0,92; $p = 0,02$) estão menos representados no grupo de casos, podendo ser considerados fator de proteção para o desenvolvimento de neoplasias cervicais (Tabela 5). A comparação entre o grupo controle e o subgrupo com lesões mais graves (HSIL+câncer), revelou menor prevalência do genótipo *p21 31C/A* (Ser/Arg) no subgrupo HSIL+câncer (OR = 0,61; IC 95% = 0,39-0,97; $p = 0,04$), sugerindo um possível efeito protetor contra o desenvolvimento de lesões mais severas. A aplicação do modelo dominante e a análise comparativa entre as distribuições alélicas dos dois grupos permitiu reiterar a proteção associada a esse genótipo. Esta associação ainda não foi relatada na literatura e talvez corresponda a uma característica da nossa população que, por apresentar elevada miscigenação étnica, apresenta frequências alélicas intermediárias entre os asiáticos e os caucasianos.

Nossos achados são divergentes daqueles observados por Bhattacharya & Sengupta (2001), Harima e colaboradores (2001) e Tian e colaboradores (2009), que evidenciaram aumento do risco de câncer cervical em mulheres portadoras do alelo *p21 31A* (Arg). Contrariamente, outros autores relataram risco de câncer cervical associado ao genótipo *p21 31CC* (Ser/Ser) (Lee JE *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2010), enquanto em alguns estudos esta associação foi demonstrada somente em relação ao adenocarcinoma associado ao HPV de alto risco (16 ou 18) (Roh *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2010).

Conforme observado para o polimorfismo *p53 72C>G*, os resultados dos vários trabalhos envolvendo o polimorfismo *p21 31C>A* e o desenvolvimento de neoplasias cervicais também apresentam resultados conflitantes (Whibley *et al.*, 2009). Ma e colaboradores (2011), em um estudo de meta-análise sobre o

polimorfismo *p21 31C>A* e o risco de câncer em geral, evidenciaram que o genótipo *p21 31AA* (Arg/Arg) conferiu leve aumento do risco para todos os tipos de câncer, tanto no modelo codominante (OR = 1,17, IC 95% = 0,99-1,37) como no modelo recessivo (OR = 1,16, IC 95% = 1,01-1,33), e, em especial, para cânceres de pulmão, esôfago e estômago. Entretanto, avaliando somente os trabalhos envolvendo câncer cervical (Roh *et al.*, 2001; Harima *et al.*, 2001; Lee JE *et al.*, 2004; Lee SA *et al.*, 2004; Bhattacharya *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2010), o genótipo *p21 31AA* (Arg/Arg) não configurou risco para neoplasias cervicais. Curiosamente, todos esses trabalhos foram realizados em população asiática.

Em outra meta-análise mais recente, foi identificada associação entre o genótipo *p21 31AA* (Arg/Arg) e aumento do risco de câncer nos indivíduos da raça branca. Semelhante aos achados do estudo anterior, os autores sugeriram que o polimorfismo *p21 31C>A* não representava risco para o desenvolvimento de câncer cervical (Liu *et al.*, 2011). Entretanto, eles apontam para o fato da divergência dos resultados dos diversos estudos ser devida, em parte, a fatores metodológicos como, tamanho amostral, material usado para obtenção do DNA, ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle e principalmente na variação da frequência desse polimorfismo entre os diferentes grupos étnicos (Liu *et al.*, 2011). A influência desses fatores em estudos de associação de polimorfismos genéticos e o desenvolvimento de câncer já foi discutida anteriormente e o presente trabalho foi desenvolvido buscando minimizá-los.

5.2.4 Estudo de associação entre combinações genotípicas e alélicas dos polimorfismos *p53* PIN3, *p53 72C>G* e *p21 31C>A* e as neoplasias cervicais

Vários estudos têm estimado a frequência haplotípica dos polimorfismos do gene *TP53*, a maioria deles envolvendo o éxon 4 e os íntrons 3 e 6. O número acumulado de variantes no mesmo cromossomo pode fornecer informação adicional sobre alterações na função da proteína *p53*, visto que estas variantes podem ter efeito aditivo ou multiplicativo sobre a função da proteína. A análise de haplótipos é mais precisa e útil do que a análise do genótipo em estimar risco para determinadas neoplasias, visto que o haplótipo define múltiplos *loci*. Além disso, tem se buscado realizar a análise de combinação de dois ou mais polimorfismos, em especial em

genes que participam de uma mesma via, que têm funções semelhantes, ou que podem interferir ou sofrer a influência um do outro.

Alguns estudos analisaram em conjunto os polimorfismos *p53* 72C>G e *p21* 31C>A, por vezes, em associação com outros polimorfismos. No estudo de Bhattacharya & Sengupta (2005) envolvendo pacientes indianas com câncer de colo uterino, apesar de ter sido observado que o genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) (OR=3,76; IC=1,03-13,80; p=0,04) e o alelo *p21* 31A (Arg) (OR=2,01; IC=1,00-4,06; p=0,05) representavam risco independente para o câncer cervical, a análise de interação entre eles não revelou significância estatística. Os autores sugeriram que apesar de não ter sido identificada interação entre os dois polimorfismos, provavelmente há influência de um sobre o outro, visto que fazem parte da mesma via de controle do ciclo celular e que uma falha na expressão de um dos genes pode ser suficiente para aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasia cervical. Outros estudos também não revelaram associação dos polimorfismos *p53* 72C/G, *p21* 31C/A e *GSTM1* em desenvolver neoplasia cervical, sendo observada interação somente entre os genótipo *GSTT1* e *p21* 31AA (Arg/Arg) (Lee SA *et al.*, 2004).

Já no estudo de Jiang e colaboradores (2010), em população chinesa, foi observada associação independente entre os polimorfismos *p53* 72C>G e *p21* 31C>A e o risco de câncer cervical. Indivíduos portadores do genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) apresentaram risco de 2,25 (IC 95% = 1,11-4,54) e indivíduos com genótipo *p21* 31CC (Ser/Ser) tiveram risco de 2,09 (IC 95% = 1,04-4,19). A análise de combinação desses genótipos revelou um efeito aditivo, com aumento do risco para 3,96 (IC 95% = 1,51-10,41).

Neste trabalho, foi observado efeito protetor para desenvolvimento de lesões mais severas em relação à combinação de genótipos *p53* PIN3 A1/A1 e *p21* 31CA (Ser/Arg) (Tabela 7). Não foi possível evidenciar um efeito aditivo ou multiplicativo nas análises de combinações de genótipos referentes aos três polimorfismos por vez (Tabelas 9). No entanto, a análise multiplicativa de alelos correspondentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A revelou um efeito protetor da combinação *p53* PIN3 A1 / *p53* 72C (Pro) / *p21* 31A (Arg) (Tabela 12) para o desenvolvimento de neoplasia cervical de alto grau ou câncer (OR=0,22; IC 95% = 0,07-0,70). O modelo ajustado para idade, fumo, uso de métodos anticoncepcionais, história familiar de câncer, DST prévia, nº de parceiros sexuais e etnia evidenciou a independência desse efeito. Já a combinação *p53* PIN3 A1/ *p53* 72C (Pro) e *p21*

31C (Ser) conferiu risco para neoplasia cervical de alto grau ou câncer apenas no modelo ajustado (OR =1,67; IC 95% = 1,03-2,72), sugerindo o efeito aditivo do risco desses alelos para o desenvolvimento das neoplasias cervicais.

Apesar da associação dos polimorfismos *p53* 72C>G e *p21* 31C>A, isoladamente ou em combinação com outros polimorfismos, com a maior suscetibilidade ao desenvolvimento das neoplasias cervicais ter sido apontada neste e em outros estudos, o papel desses polimorfismos ainda não está definido. É importante destacar que se existe associação entre polimorfismos do gene *TP53* e *p21* e as neoplasias cervicais, a magnitude do risco parece modesta nas análises isoladas, não se mostrando suficientemente forte para prever o desenvolvimento ou a progressão do câncer cervical, o que reforça a importância das análises de combinações de genótipos e alelos. Cabe salientar ainda que o efeito dos polimorfismos analisados pode sofrer a ação de outros fatores genéticos e ambientais. Dessa forma, a identificação da complexa rede de mecanismos que participam da iniciação e progressão da carcinogênese cervical representa um desafio, mas seu conhecimento tem implicações clínicas importantes.

5.3 Avaliação imunohistoquímica da expressão de p53, p21, p16, ciclina D1 e Ki-67 nas neoplasias cervicais

O processo da carcinogênese cervical, cujo principal fator etiológico é a infecção pelo HPV, inclui várias etapas e a progressão de lesão de baixo grau até o carcinoma invasor ainda permanece desconhecida (Kim & Zhao, 2005). Morfologicamente, as alterações causadas pela infecção por HPV podem ser divididas em dois processos distintos: um deles considerado benigno e outro representado por lesões de alto grau com capacidade de evoluir para carcinoma invasor em um período longo de tempo (Galgano *et al.*, 2010). A classificação histopatológica das neoplasias intraepiteliais cervicais podem apresentar desafios diagnósticos e nem sempre são reprodutíveis (Øvestad *et al.*, 2011). O estudo imunohistoquímico da expressão de marcadores das proteínas do ciclo celular poderia representar uma ferramenta útil para diagnóstico e, possivelmente, prognóstico das lesões cervicais, proporcionando, assim o aumento da acurácia

diagnóstica (Vinyuvat *et al.*, 2008; Ordi *et al.*, 2009; Bergeron *et al.*, 2010; Øvestad *et al.*, 2011; Ozaki *et al.*, 2011).

A p53 participa do controle do ciclo celular através da indução da expressão de várias proteínas, como p21, p27 e p16, que inibem complexos de ciclina-CDK. A progressão do ciclo celular é, então, interrompida nos pontos de checagem G1/S e G2/M, para que ocorra o reparo do material genético danificado. Caso não seja possível a correção, a proteína p53 estimula genes relacionados à apoptose (Vogelstein & Kinzler, 1992).

A positividade imunohistoquímica para p53 no tecido é considerada evento “anormal”, devido a sua meia-vida curta, e pode estar associada à presença de uma proteína truncada, como produto de um gene *TP53* mutado, cuja meia-vida é longa. Caso não haja mutação no gene *TP53*, o acúmulo anormal pode ser decorrente da presença de uma proteína p53 funcionalmente inativa (Huang *et al.*, 2001). O modelo da carcinogênese cervical está associado à ação das oncoproteínas E6 e E7 dos HR-HPV que se ligam e inativam a p53 e pRb, respectivamente, promovendo a sua destruição via ubiquitinação (Doobar, 2006). Em situações de estresse crônico, a p53 é estabilizada tanto pela inativação da MDM2, que é capaz de estabilizar a p53 por inibir a sua degradação via proteassoma 26S, como pela NQO (NADPH Quinona Oxidoreductase) que ao se ligar diretamente à p53 impede a sua degradação independentemente de ubiquitinação no proteassoma 20S (Gong *et al.*, 2007).

Vários autores observaram superexpressão de p53 nas neoplasias cervicais, incluindo lesões de baixo grau, alto grau e câncer (Tsuda *et al.*, 2003; Bahnassy *et al.*, 2007; Conesa-Zamora *et al.*, 2009). Em alguns estudos, foi observada uma associação entre regressão espontânea de lesões de alto grau com expressão aumentada de p53 e pRb, detectada na metade inferior da espessura do epitélio (Baak *et al.*, 2005; Øvestad *et al.*, 2011). Uma explicação para essa correlação se baseia na hipótese de que o primeiro sinal de regressão seria o aumento de expressão das proteínas p53 e pRb, que refletiria uma resposta imune do hospedeiro com consequente redução dos níveis de E6 e E7. A confirmação do uso desses biomarcadores para predizer quais mulheres portadoras de HSIL apresentariam regressão completa da lesão em alguns meses, causaria mudanças importantes na conduta clínica. É descrito na literatura regressão em cerca de 30 a 35% dos casos de HSIL, o que representa número significativo de mulheres jovens que poderiam ser acompanhadas por citologia. Caso fosse confirmada clínica e citologicamente a

involução da lesão, a paciente seria poupada de procedimentos que sabidamente carregam risco, ainda que pequeno, de complicações ginecológicas, principalmente relacionadas com futuras gestações (Øvestad *et al.*, 2011). Em nosso estudo, a expressão de p53 não se mostrou um bom biomarcador, visto que os níveis de positividade foram elevados nos três grupos (LSIL, HSIL e câncer), o que inviabiliza o seu uso na diferenciação de lesões de diferentes graus. Até o momento, os estudos apresentam resultados controversos em relação à expressão de p53 e nas neoplasias cervicais e ainda não está definido se esta informação pode ser útil para definir estratégias de tratamento (Ikuta *et al.*, 2005; Khunamornpong *et al.*, 2008; Hanprasertpong *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010).

Dentre as várias funções atribuídas à proteína p53, destaca-se a sua capacidade de controlar o ciclo celular através da ativação do gene *p21^(WAF1)*. A proteína p21 é um inibidor de complexos de ciclina/CDK e sua ação promove a parada do ciclo celular nos pontos de checagem G1/S e G2/M. A proteína p21 pode também ser ativada por vias independentes de p53, como pela oncoproteína E7 dos HR-HPVs (Cho *et al.*, 2002), o que compromete a inativação de CDKs e a replicação de DNA dependente do PCNA. Em várias neoplasias humanas, observa-se inativação e consequente redução da expressão de p21 (Abbas & Dutta, 2009). Entretanto, a expressão de p21 nas neoplasias cervicais mostra resultados conflitantes (Kim & Zhao, 2005), com alguns trabalhos mostrando baixos níveis de expressão de p21 em câncer cervical invasor e microinvasor quando comparado com mucosa normal (Huang *et al.*, 2001).

Neste estudo, quanto maior o grau da lesão, maior foi a positividade da expressão de p21. Achados semelhantes foram observados por outros autores (Lie *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2001). A expressão elevada de p21 nos casos de HSIL e câncer pode ser explicada pela interação entre a oncoproteína viral E7 com p21, o que anula o seu efeito inibidor da ativação dos complexos ciclinas/CDKs; pela existência de mutações inibidoras da p21 ou dos seus alvos; pela interação não funcional com os complexos ciclinas/CDKs (Kim & Zhao, 2005; Bahnassy, 2007). Uma característica da positividade imunohistoquímica da p21 observada em nosso trabalho foi o nível de marcação no epitélio, que se mostrou suprabasal nas lesões de baixo grau e atingiu, na dependência do grau da lesão, níveis mais elevados, com as lesões de alto grau apresentando positividade nas células mais superficiais. Essa mesma distribuição foi descrita em outros trabalhos (Conesa-Zamorra *et al.*, 2009).

A distribuição epitelial da expressão de p21 foi um dos parâmetros que mostrou nível de correlação moderado em relação à capacidade de diferenciar os grupos de lesão ($r = 0,44$) (Tabela 17). Entretanto, esta correlação não é forte o suficiente para apontarmos a p21 como marcador adjunto do painel imunohistoquímico nos casos de difícil diagnóstico das neoplasias cervicais.

Até o momento, os biomarcadores considerados eficientes e úteis na rotina diagnóstica, com comprovada acurácia e conseqüente incremento do diagnóstico das lesões cervicais, são a p16 e o Ki-67 (Ordi *et al.*, 2009, Bergeron *et al.*, 2010; Ozaki *et al.*, 2011). Deste modo, também foram analisados estes marcadores, bem como, a ciclina D1 que pertence à via da ciclina D1-pRb-p16 no ciclo celular.

A proteína p16^{INK4} pertence à família INK4 de inibidores de CDK que ao se ligar à CDK4 e CDK6, inibe a interação destas CDK com a ciclina D1, impedindo assim a fosforilação da pRb e liberação do fator de transcrição E2F. Análise imunohistoquímica tem demonstrado positividade difusa e forte para p16^{INK4} em quase todos os casos de lesões de alto grau e câncer associados à infecção pelos HPV de alto risco ou risco intermediário, e raramente detectada na mucosa escamosa normal ou nos casos de lesão de baixo grau, que quando positiva exibe coloração fraca e focal (Klaes *et al.*, 2002; Bahnassy *et al.*, 2007). Desse modo, a imunomarcagem para p16 tem sido usada com sucesso para identificar neoplasias intraepiteliais de alto grau ou câncer cervical, sendo considerada um marcador específico de superexpressão de HPV-E7 ou de qualquer evento que resulte em inibição da proteína Rb (Redman *et al.*, 2008; Galgano *et al.*, 2010; Hwang & Shroyer, 2012). A justificativa para a superexpressão deste marcador em neoplasias cervicais é que a inativação da função da pRb pela oncoproteína E7 do HR-HPV, estimula a transcrição do gene p16^{INK4a}, levando a uma superexpressão constante e forte da proteína p16, que se acumula no núcleo e citoplasma das células cervicais (Horn *et al.*, 2008). Neste estudo, a imunomarcagem de p16 foi negativa na maioria dos casos de LSIL (75%), enquanto a superexpressão de p16 (de intensidade forte e localização predominantemente citoplasmática) mostrou associação significativa com a severidade da lesão, com grau de correlação moderado a forte ($r=0,66$), de modo semelhante ao que tem sido descrito na literatura (Klaes *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Galgano *et al.*, 2010).

Além de ser uma ferramenta importante no diagnóstico, alguns autores evidenciaram que a imunomarcagem para p16 também pode ter valor prognóstico

nas lesões de baixo grau (Klaes *et al*, 2002; Ozaki *et al*, 2011). Já em outro estudo foi revelada uma associação entre superexpressão de p16 com pior prognóstico em pacientes em estágio avançado da doença, comportando-se como um importante fator preditivo de metástase linfonodal (Huang *et al.*, 2012).

A ciclina D1 forma complexos funcionais com quinases dependentes de ciclina (CDK-4 e CDK-6) que fosforilam a proteína Rb no meio da fase G1. Como consequência, ocorre a liberação do fator E2F do complexo pRb-E2F e a ativação da transcrição de genes necessários para a a fase S do ciclo celular. Na mucosa cervical infectada pelo HPV, não há necessidade da presença de ciclina D1 para que haja a progressão do ciclo celular, visto que a oncoproteína E7 do HPV ao se ligar e degradar a pRb, libera o fator de transcrição E2F, promovendo, assim, a síntese do DNA e aumento da proliferação celular, independentemente da atuação da ciclina D1. Em relação à ciclina D1 existe discordância entre os diversos estudos. Este trabalho revelou maior positividade para ciclina D1 no grupo LSIL (91,9%) quando comparado com os grupos HSIL (47,5%) e câncer (56,2%) (Tabela 13). Além disso, a intensidade da positividade foi mais fraca e esparsa, e detectada nas camadas mais inferiores da mucosa, nos casos de HSIL, e em uma faixa de poucas células próximas da membrana basal nos maciços de células malignas nos casos de câncer. Alguns estudos obtiveram resultados semelhantes (Bae *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002; Vijayalakshmi *et al.*, 2007; Little & Stewart, 2010). De modo contrário, outros estudos observaram superexpressão de ciclina D1 somente nos casos de NIC III e carcinoma infiltrante (Nichols *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 2001; Bahnassy *et al.*, 2007; Conesa-Zamora *et al.*, 2009). Em um estudo recente que correlacionou expressão de ciclina D1 com lesões glandulares endocervicais, foi relatada negatividade ou positividade focal nas neoplasias glandulares (Little & Stewart, 2010). Os autores sugeriram que a ciclina D1 poderia ser um biomarcador útil nos casos de lesões glandulares que apresentem dificuldade diagnóstica, visto que a expressão de ciclina é normalmente observada no epitélio sadio e naquele com alterações reacionais.

A discordância dos resultados entre os diferentes estudos pode ser devida a problemas metodológicos como a qualidade do anticorpo usado e a interpretação dos resultados.

O comportamento e desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais se correlacionam com o índice de proliferação, podendo ser evidenciado por estudo imunohistoquímico com anticorpo MIB1, que tem padrão de coloração estável e é

equivalente ao Ki-67. A positividade deste marcador nos diferentes graus de neoplasias intraepiteliais cervicais tem revelado forte correlação com a extensão da desorganização da maturação da mucosa escamosa, e tem sido usado como ferramenta diagnóstica adjunta na graduação e prognóstico das neoplasias intraepiteliais (Kruse *et al.*, 2004; Baak *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2008; Hanprasertpong, *et al.*, 2010). Desse modo, a superexpressão de Ki-67 nas camadas mais superficiais da mucosa escamosa tem forte correlação com a proliferação desordenada observada nas lesões de alto grau (Conesa-Zamora *et al.*, 2009). No entanto, para evitar erros diagnósticos, é importante saber que positividade em baixos níveis e salteada para Ki-67 é vista nas camadas basal e parabasal da mucosa escamosa normal e a sua expressão aumentada também é observada em condições inflamatórias ou processos regenerativos benignos, como metaplasia escamosa imatura (Hanprasertpong, *et al.*, 2010; Hwang & Shroyer, 2012). O nosso trabalho também confirmou os achados da literatura, tendo sido observada correlação entre a distribuição epitelial e o grau da lesão ($r = 0,50$) (Tabela 17). Alguns estudos observaram que positividade de Ki-67, isoladamente ou em associação com a expressão de p16, pode ser usada como fator prognóstico, com capacidade de prever progressão das lesões de baixo para alto grau (Kruse *et al.*, 2004; Hanprasertpong *et al.*, 2010; Samarawardana *et al.*, 2011; Ozaki *et al.*, 2011).

O estudo imunohistoquímico para HPV *pool* e HPV 16 revelou elevada positividade independentemente dos grupos de lesão. Apesar de não ser um método tão sensível e específico como a PCR, esses resultados estão de acordo com a literatura que relata elevada positividade para HPV nos casos de HSIL e câncer cervical (de Sanjosé *et al.*, 2010; Illades-Aguilar *et al.*, 2010; Alemany *et al.*, 2012). Apesar de 83,3%, dos casos de câncer terem apresentado positividade para HPV *pool*, somente 33% foram positivos para HPV16. Seria esperado um número maior de casos HPV 16 positivos nesse grupo. Uma possível explicação para esse achado é o fato de que no câncer as partículas L1 do capsídeo viral, que é reconhecida pelo anticorpo anti-HPV16, normalmente são raras ou ausentes nas células malignas, que apresentam o genoma viral integrado.

A associação observada entre positividade de HPV 16 e a expressão de p16 em nosso estudo também é descrita na literatura (Conesa-Zamora *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2012). Uma possível explicação é que a superexpressão de p16 seria decorrente da ação da E7 de HR-HPV, incluindo o tipo 16, que degrada a pRb.

Nosso estudo também evidenciou associação entre positividade de HPV 16 e expressão de ciclina D1. Apesar da ciclina D1 estar menos expressa nas lesões de alto grau e câncer, ela se mostrou positiva em grande parte dos casos de LSIL (91,9%) e, neste grupo, também foi observada elevada positividade para HPV 16 (85,1%).

O estudo imunohistoquímico da expressão das proteínas envolvidas no ciclo celular avaliadas neste trabalho nos permitiu definir um perfil de expressão das mesmas nos diferentes grupos de lesão. No geral, a lesão escamosa intraepitelial cervical de baixo grau (LSIL), que corresponde à infecção pelo HPV na sua fase produtiva quando as partículas virais estão sob a forma episomal, apresentou positividade para p53, p21, ciclina D1 e Ki-67 e negatividade para p16 nas camadas mais inferiores do epitélio. A expressão de p53 e consequentemente da p21 pode ser interpretada como uma resposta celular ao dano representado pela infecção por HPV. Visto que este vírus estimula a proliferação, a expressão de ciclina D1 está aumentada, e esse efeito é evidenciado pela positividade de Ki-67. Por outro lado, a negatividade de p16 pode ser explicada pelo fato da oncoproteína E7 ter sua expressão inibida pela E2 e, desse modo, a pRb, que controla a expressão de p16, ainda não está com a sua função comprometida.

A integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro resulta em aumento da expressão das oncoproteínas virais E6 e E7, tornando as células suscetíveis à progressão neoplásica. As lesões cervicais de alto grau e câncer apresentaram elevada positividade para p53, p21, p16 e Ki-67, predominantemente nas camadas mais superficiais do epitélio. Em relação à ciclina D1, a lesão de alto grau mostrou ausência ou positividade leve e fraca, observada principalmente nos terços inferior e médio da espessura do epitélio.

Não foi possível identificar qualquer associação dos níveis de expressão de p53 e p21 ou da positividade de HPV *pool* e HPV 16 com os polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p2131C>A*. Os intervalos de confiança se mostraram amplos, devido provavelmente ao tamanho reduzido de amostras incluídas, principalmente nos grupos de câncer e LSIL. Entretanto, o genótipo *p53* 72GG (Arg/Arg) prevaleceu nos casos negativos para anti-HPV *pool* e também foi observada uma tendência a maior prevalência desse genótipo nos casos negativos para ciclina, especialmente no grupo de lesões de alto grau e câncer. Além disso, esse genótipo foi menos representado nos casos negativos para p21. Em relação ao polimorfismo *p21*

31C>A, o genótipo *p21* 31CC (Ser/Ser) foi menos prevalente nos casos negativos para a expressão de p16.

Considerando que a maioria das pacientes p16 negativas pertence ao grupo LSIL, a menor prevalência do genótipo *p21* 31CC observada neste grupo nos permite sugerir ilação entre este achado e os resultados observados na análise multiplicativa de alelos ajustada para as covariáveis, em que a combinação dos alelos *p53* PIN3 A1 (sem a inserção de 16 pb), alelo *p53* 72C (Pro) e o alelo *p21* 31C (Ser) conferiu risco para desenvolvimento de neoplasias mais severas.

Entretanto, não há relato na literatura sobre essas correlações, e sua confirmação depende de estudos adicionais.

Os estudos na literatura correlacionando alterações genéticas de *TP53* e *p21* com expressão das respectivas proteínas em neoplasias cervicais são escassos. Ngan e colaboradores (1997) não observaram associação entre a expressão imunohistoquímica de p53, a superexpressão de mRNA e mutações no gene *TP53* em casos de câncer cervical, que são consideradas raras e não relacionadas à presença de HPV 16 ou 18. De modo semelhante, Bahnassy e colaboradores (2007) não identificaram correlação das alterações genéticas (mutação) com os níveis de expressão de p53. Mutação no gene *TP53* foi observada em 5 dos 43 casos de câncer cervical e destes, três casos apresentaram aumento da expressão de p53. A superexpressão de p53 foi identificada somente nos casos de NIC III (18,4%) e câncer (44,2%), sendo apontada, então, como evento tardio da carcinogênese cervical. Apesar do aumento da expressão de p21 nas lesões de alto grau e câncer, os autores não realizaram estudo genético de *p21*.

Em carcinomas de esôfago, foi possível identificar correlação entre o alelo *p53* 72Arg e a superexpressão de p53 e esta associação foi mais forte nos grupos de pacientes expostos ao fumo e álcool e nos pacientes com idade mais avançada (maior que 70 anos) (Lee *et al.*, 2006). Na população brasileira, não se observou diferença significativa entre o padrão de expressão da proteína p21, os polimorfismos do códon 31 e a da região 3'UTR do gene *p21*, e os três tipos histológicos de tumores do sistema nervoso central (ependimomas, meduloblastomas e astrocitomas) (Valentin *et al.*, 2009).

Este estudo é pioneiro na avaliação de possíveis associações entre os polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31C>A e os níveis de expressão no tecido pela técnica de imunohistoquímica das proteínas p53, p21, p16, ciclina D1 e

Ki-67 em amostras de pacientes portadoras de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau e câncer de colo uterino. Nossos resultados sugerem a associação do polimorfismo *p21* 31C>A, isoladamente ou em combinação com os polimorfismos do gene *TP53*, e o desenvolvimento de lesões mais severas e câncer. O polimorfismo *p53* 72C>G se comportou como modificador do risco atribuído ao uso de anticoncepcional de uma paciente apresentar neoplasias mais severas. A análise imunohistoquímica de proteínas envolvidas no ciclo celular confirmou a aplicabilidade prática dos biomarcadores p16 e Ki-67, e o potencial de uso de p21 e ciclina D1 como ferramenta adjuvante no diagnóstico diferencial entre lesões de baixo grau e alto grau, incrementando a acurácia diagnóstica das lesões cervicais.

6 CONCLUSÕES

- As distribuições alélicas e genóticas correspondentes aos polimorfismos *p53* PIN3 e *p53* 72C>G não se apresentaram diferentes entre os grupos caso e controle e entre os subgrupos de casos, demonstrando que estes polimorfismos não estão relacionados com o desenvolvimento de câncer cervical na população estudada.
- O genótipo *p53* 72CC (Pro/Pro) modificou, em aproximadamente 2,5 vezes, o risco atribuído ao uso de métodos anticoncepcionais de mulheres pertencentes ao grupo de casos apresentarem lesões mais graves (HSIL+câncer).
- O genótipo *p21* 31AA e o alelo *p21* 31A foram menos prevalentes no grupo casos do que nos controles, sugerindo efeito protetor contra o desenvolvimento de neoplasias cervicais, independentemente dos fatores de risco clássicos.
- Nossos resultados indicam que o genótipo *p21* 31CA (Ser/Arg) é um fator de proteção independente contra o desenvolvimento de lesões cervicais mais severas (HSIL+câncer).
- O genótipo *p21* 31CA (Ser/Arg) diminuiu a chance de apresentar lesão mais severa em pacientes com neoplasia cervical não fumantes, que tiveram número de parceiros maior ou igual a cinco, sexarca com mais de 16 anos ou escolaridade maior que o ensino fundamental.
- As combinações de genótipos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31CA (Ser/Arg) não se mostraram associadas ao desenvolvimento e/ou severidade das neoplasias cervicais.
- No modelo ajustado para idade, fumo, uso de método anticoncepcional, história familiar de câncer, DST prévia, nº de parceiros sexuais e etnia, as combinações de alelos referentes aos polimorfismos *p53* PIN3, *p53* 72C>G e *p21* 31CA (Ser/Arg) se correlacionou com o desenvolvimento de neoplasias cervicais mais severas, com a combinação *p53* PIN3 A1 (sem a duplicação de 16 pb), alelo *p53* 72C (Pro) e o alelo *p21* 31A (Arg) exibindo efeito protetor e a combinação *p53* PIN3 A1 (sem a duplicação de 16 pb), alelo *p53* 72C (Pro) e o alelo *p21* 31C (Ser) conferindo risco.
- A severidade da lesão está relacionada a um aumento dos níveis de expressão de *p53*, *p21* e *p16*, e redução da expressão de ciclina D1.

- A positividade imunohistoquímica de p53, p21, p16 e Ki-67 foi maior nas camadas mais superficiais do epitélio nas lesões mais severas, porém os marcadores que mostraram maior correlação com o grau de neoplasia cervical foram p16 e Ki-67.
- Não foram evidenciadas correlações entre a expressão das proteínas p53 e p21 e os polimorfismos nos genes *TP53* (*p53* PIN3 e *p53* 72C>G) e *p21* (*p21* 31C>A).

REFERÊNCIAS

Abba MC, Villaverde LM, Gómez MA, Dulout FN, Laguens MR, Golijow CD. The p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Jul 1;109(1):63-6.

Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun; 9(6):400-14.

Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* [periódico na Internet]. 2008 Jul 1 [acesso em 2010 Jan];10:[18 p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678956/pdf/nihms-70444.pdf>

Agorastos T, Lambropoulos AF, Constantinidis TC, Kotsis A, Bontis JN. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and invasive cervical neoplasia in Greek women. *Eur J Cancer Prev.* 2000 Apr;9(2):113-8.

Akasofu M, Oda Y. Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Virchows Arch.* 1995;425(6):593-602.

Aleman L, Pérez C, Tous S, Llombart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol.* 2012 Mar; 124(3):512-7.

Alfsen GC, Reed W, Sandstad B, Kristensen GB, Abeler VM. The prognostic impact of cyclin dependent kinase inhibitors p21WAF1, p27Kip1, and p16INK4/MTS1 in adenocarcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical evaluation of expression patterns in population-based material from 142 patients with international federation of gynecology and obstetrics stage I and II adenocarcinoma. *Cancer.* 2003 Nov 1;98(9):1880-9.

Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine.* 2008 Aug 19;26(Suppl 11):L16–36.

Andersson S, Rylander E, Strand A, Sällström J, Wilander E. The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer.* 2001 Oct 19;85(8):1153-6.

Anschau F, Schmitt VM, Gonçalves MAG, Garicochea B. Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(10):607-12.

Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutat Res.* 2003 Nov;544(2-3):375-83.

Arbel-Alon S, Menczer J, Feldman N, Glezerman M, Yeremin L, Friedman E. Codon 72 polymorphism of p53 in Israeli Jewish cervical cancer patients and healthy women. *Int J Gynecol Cancer*. 2002 Nov-Dec;12(6):741-4.

Baak JPA, Kruse AJ, Garland SM, Skaland I, Janssen EA, Tabrizi S, et al. Combined p53 and retinoblastoma protein detection identifies persistent and regressive cervical high-grade squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol*. 2005 Aug;29(8):1062-6.

Baak JPA, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van Diermen B, Skaland I, et al. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol*. 2006 Oct;59(10):1017-28.

Backer FMA, Mustapha NRN, Othman NH. Clinicopathological comparison of adenocarcinoma of cervix and endometrium using cell cycle markers: P16ink4a, P21waf1, and p27Kip1 on 132 cancers. *Infect Dis Obstet Gynecol* [periódico na Internet]. 2011 Oct 24 [acesso em 2012 Feb];2011:[6 p.]. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/idog/2011/857851/>

Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, et al. Aberrant expression of cyclinD1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol*. 2001 Jun;81(3):341-7.

Baek WK, Cho JW, Suh SI, Suh MH, Shin DH, Cho CH, et al. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Korean women. *J Korean Med Sci*. 2000 Feb;15(1):65-7.

Bahnassy AA, Zekri ARN, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol* [periódico na Internet]. 2007 May 24 [acesso em 2010 Jun];7(4):[11 p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6890-7-4.pdf>.

Baldez da Silva MF, Guimarães V, Silva MA, Medeiros do Amaral CM, Beçak W, Stocco RC, et al. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genet Mol Res*. 2012 Mar 1;11(1):462-6.

Baldi A, De Luca A, Esposito V, Campioni M, Spugnini EP, Citro G. Tumor suppressors and cell-cycle proteins in lung cancer. *Patholog Res Int* [periódico na Internet]. 2011 Oct 5 [acesso em 2012 Feb]; 2011:[12 p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189597/pdf/PRI2011-605042.pdf>

Barbisan G, Contreras A, Pérez LO, Difranza L, Golijow CD. The effect of *TP53* códon 72 and *RNASEL* codon 462 polymorphisms on the development of cervical cancer in Argentine women. *Cancer Genetics*. 2011 May;204:270-7.

Beckman G, Birgander G, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Heredity*. 1994 Sep-Oct;44:266-70.

Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R; European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16 INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2010 Mar;133(3):395-406.

Berlin Grace. HPV type 18 is more oncopotent than HPV 16 in uterine cervical carcinogenesis although HPV 16 is the prevalent type in Chennai, India. *Ind J of Cancer.* 2009 Jul-Sep; 46(3): 203-7.

Bhattacharya P, Duttagupta C, Sengupta S. Proline homozygosity in codon 72 of p53: a risk genotype for human papillomavirus related cervical cancer in Indian women. *Cancer Lett.* 2002 Dec;188(1-2):207-11.

Bhattacharya P, Sengupta S. Lack of evidence that proline homozygosity at codón 72 of p53 and rare arginine allele at codón 31 of p21, jointly mediate cervical cancer susceptibility among Indian women. *Gynecol Oncol.* 2005 Oct; 99:176-82.

Birgander R, Sjalander A, Saha N, Spitsyn V, Beckman L, Beckman G. The codon 31 polymorphism of the p53-inducible gene p21 shows distinct differences between major ethnic groups. *Hum. Hered.* 1996 May-Jun;46(3):148-54.

Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R, et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Bio Chem.* 2007 Oct 26;282(43):31803-11.

Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, et al. Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. *Cancer Invest.* 2008 Mar;26(2):168-72.

Bond GL, HU W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targests.* 2005 Feb;5(1):3-8.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun7; 87(11):796-802.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz M, Meijer CJ, Shah KV. The causal relationship between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr;55(4):244-65.

Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, Maito AB, Vassallo J, Pignataro F, et al. Expression of p16^{INK4a} and cervical infection with high-risk human papillomavirus are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2008 Sep-Oct;18(5):1060-4.

Brenna SMF, da Silva IDC, Zeferino LC, Pereira J, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Prevalence of codón 72 P53 polymorphism in Brazilian women with cervix cancer. *Genet Mol Biol.* 2004 May; 27(4):496-9.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jan;16(1):1-17.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):191-9.

Castellsagué X, De Sanjosé S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Muñoz J, et al. HPV and cervical cancer in the world 2007 report. *Vaccine.* 2007;25(Suppl 3):C1-26.

Cavalcanti SMB, Zardo LG, Passos MR, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect.* 2000; 40(1):80-7.

Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene.* 1994 Oct;9(10):3021-4.

Cheung TH, Lo KW, Yu MM, Yim SF, Poon CS, Chung TK, et al. Aberrant expression of p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} in cervical carcinoma. *Cancer Lett.* 2001 Oct 22;172(1):93-8.

Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J.* 2002 Dec;43(6):722-8

Chorev M, Carmel L. The function of introns. *Front Genet* [periódico na Internet]. 2012 Apr 13 [acesso em 2012 Aug];3:55[15p.]. Disponível em http://www.frontiersin.org/Bioinformatics_and_Computational_Biology/10.3389/fgene.2012.00055/abstract

Ciotti M, Coletti A, Giuliani L, Cappiello G, Syrjanen K, Favalli C. The p53 codon 72 arg/arg homozygous women in central Italy are at increased risk for HPV infections. *Anticancer Res.* 2006 Sep-Oct;26(5B):3745-8.

Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2001 Aug;82(2):238-46.

Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jul 7;89(1):101-5.

Comar M, Molin GD, Guaschino S, Campello C. p53 at codon 72 polymorphism, human papillomavirus infection and cervical lesions: a cross-sectional study from northeastern Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Jun 15;114(2): 210-4.

Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, et al. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma. A Tissue Microarray Study. *Am J Clin Pathol.* 2009 Sep;132(3):378-90.

Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PM, de Freitas SE, et al. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004 Apr 1;150(1):44-9.

Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, et al. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer* [periódico na Internet]. 2008 Jan 29 [acesso em 2012 Mar];8(32):[7 p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2407-8-32.pdf>

de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9.

de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1048-56.

Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer.* 2007 Feb 25;111(1):1-14.

Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol.* 2000 Apr;77(1):129-36.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lon).* 2006 May;110(5):525-41.

Drummond SN, De Marco L, Pordeus Ide A, Barbosa AA, Gomez RS. TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2002 Nov-Dec; 22(6A):3379-81.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):357-65.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):817-25.

El khair M, Ennaji MM, El kebbaj R, Mhand RA, Attaleb M, El Mzibri M. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Moroccan women. *Med Oncol.* 2010 Sep;27(3):861-866.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. [acesso em 2012 jul 14] Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>

Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MG, Fernandes TA, Azevedo PR, Sobrinho JS, et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. *BMC Res Notes*. 2010 Apr 8;3(1):96-102.

Fernandes TA, Lima GL, De Souza FC, Fernandes JV, Meissner RV. Evaluation of the polymorphisms in the exons 2 to 4 of the TP53 in cervical carcinoma patients from a Brazilian population. *Cell Mol Biol*. 2008 Jun1;54 Suppl:OL1025-31.

Ferreira da Silva I, Koifman RJ, Quinto Santos Souza C, Ferreira de Almeida Neto O, Koifman S. TP53 genetic polymorphisms and environmental risk factors associated with cervical carcinogenesis in a cohort of Brazilian women with cervical lesions. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(13-14):888-900.

Francisco G, Menezes PR, Eluf-Neto J, Chammas R. Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. *Int J Cancer*. 2011 Aug 15;129(4):920-30.

Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007 Sep-Oct;49(5):297-301.

Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2010 Aug;34(8):1077-87.

Garner E, Raj K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle*. 2008 Feb 1;7(3):277-82.

Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. 2004 Mar 11; 23 (10):1954-6.

GeneCards® - The Human Gene Compendium: tumor protein p53 [homepage na Internet]. Rehovot, Israel: Weizmann Institute of Science; 2009 [acesso em 2012 May]. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53#>

GeneCards® - The Human Gene Compendium: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) [homepage na Internet]. Rehovot, Israel: Weizmann Institute of Science; 2009 [acesso em 2012 May]. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1A>

Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, Alderisio M, Vecchione A. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and *in situ* squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep;6(9):3600-6.

Giannoudis A, Graham DA, Southern SA, Herrington CS. p53 codon 72 ARG/PRO polymorphism is not related to HPV type or lesion grade in low- and high-grade

squamous intra-epithelial lesions and invasive squamous carcinoma of the cervix. *Int J Cancer*. 1999 Sep 24;83(1):66-9.

Gomes CC, Drummond SN, Guimarães AL, Andrade CI, Mesquita RA, Gomez RS. p21/WAF1 and cyclin D1 variants and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar;37(3):151-6.

Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswal AK. NRH:Quinone Oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res*. 2007 Jun 1; 67(11):5380-8.

Grace VMB, Shalini JV, Iekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2003 Oct;91(1):51-8.

Graflund M, Sorbe B, Karlsson M. Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, and p21(WAF1/CIP1) in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome. *Int J Gynecol Cancer*. 2002 May-Jun;12(3):290-8.

Graflund M, Sorbe B, Sigurdardóttir S, Karlsson MG. Relation between HPV-DNA and expression of p53, bcl-2, p21WAF-1, MIB-1, HER-2/neu and DNA ploidy in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome. *Oncol Rep*. 2004 Jul;12(1):169-76.

Gravina S, Lescai F, Hurteau G, Brock GJ, Saramaki A, Salvioli S, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the p21 (CDKN1A) gene and correlations with longevity in the Italian population. *Aging*. 2009 May;1(5):470-80.

Grinsztejn B, Veloso VG, Levi JE, Velasque L, Luz PM, Friedman RK, et al. Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int J Infect Dis*. 2009 Jan;13(1):72-80.

Grochola LF, Zeron-Medina J, Mériaux S, Bond GL. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [periódico na Internet]. 2010 May [acesso em 2010 Oct]; 2(5):[19 p.]. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/5/a001032.full.pdf+html>

Grulich AE, Jin F, Poynten IM, Vajdic CM. HIV, cancer, and aging. *Sex Health*. 2011 Dec;8(4):521-5.

Hall PA, McCluggage WG. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol*. 2006 Jan;208(1):1-6.

Hanprasertpong J, Tungsinmunkong K, Chichareon S, Wootipoom V, Geater A, Buhachat R, et al. Correlation of p53 and Ki-67 (MIB-1) expressions with clinicopathological features and prognosis of early stage cervical squamous cell carcinomas. *J Obstet Gynaecol Res* 2010 Jun;36(3):572-80.

Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. *Int J Mol Med*. 2001 Mar;7(3):261-4.

Haws AL, Woeber S, Gomez M, Garza N, Gomez Y, Rady P, et al. Human papillomavirus infection and P53 codon 72 genotypes in a Hispanic population at high-risk for cervical cancer. *J Med Virol*. 2005 Oct;77(2):265-72.

Hayes VM, Hofstra MW, Buys CHCM, Hollema H, van der Zee AG. Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. *Lancet*. 1998 Nov;352(9142):1756.

He XF, Su J, Zhang Y, Huang X, Liu Y, Ding DP, et al. Association between the p53 polymorphisms and breast cancer risk: meta-analysis based on case-control study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130:517-29.

Helland A, Langerød A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Børresen-Dale AL. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998 Dec 10;396(6711):530-1.

Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol*. 1988 Apr;158(4):910-3.

Hernádi Z, Szarka K, Sáyó T, Krasznai Z, Veress G, Póka R. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow up. *BJOG*. 2003 Feb;110(2):205-9.

Honma HN, De Capitani EM, Perroud MW Jr, Barbeiro AS, Toro IF, Costa DB, et al. Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1*B polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. *Lung Cancer*. 2008 Aug;61(2):152-62.

Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, et al. Immunostaining for p16^{INK4a} used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2008 Apr;32(4):502-12.

Hu L, Duo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol*. 2005 Feb;18(2):267-73.

Hu Z, Li X, Qu X, He Y, Ring BZ, Song E, et al. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2010 Apr; 31(4):643-7.

Huang LW, Chou YY, Chao SL, Chen TJ, Lee TT. p53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome. *Gynecol Oncol*. 2001 Nov; 83(2):348-54.

Huang LW, Seow KM, Lee CC, Lin YH, Pan HS, Chen HJ. Decreased p21 expression in HPV-18 positive cervical carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2010 Mar;16(1):81-6.

Huang LW, Lee CC. p16INK4a overexpression predicts lymph node metastasis in cervical carcinomas. *J Clin Pathol*. 2012 Feb;65(2):117-21.

Humbey O, Aubin F, Cairey-Remonnay S, Riethmuller D, Pretet JL, Fest T, et al. TP53 polymorphism at exon 4 in caucasian women from eastern France: lack of correlation with HPV status and grade of cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002 Jun 10;103(1):60-4.

Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *J Oncol* [periódico na Internet]. 2011 Oct 29 [acesso em 2012 May];2012:[9 p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3205687/pdf/JO2012-507286.pdf>

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses vol. 90 [monografia na Internet]. Lyon (FR): WHO-IARC; 2007. 636p. [acesso em 2010 Jun 6]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>

IARC Screening Group; Frappart L, Fontanière B, Lucas E, Sankaranarayanan R (editores). Histopathology and cytopathology of the Uterine Cervix – Digital Atlas Histopathologie et Cytopathologie du Col Utérin – Atlas Numérique. Lyon (FR): WHO-IARC; 2004. WHO histological classification of tumours of the uterine cervix; [acesso em 2012 março]. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/atlasclassifwho.php>

Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero Ldel C, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2):291-6.

Ikuta A, Saito J, Mizokami T, Nakamoto T, Yasuhara M, Nagata F, et al. Correlation p53 expression and human papillomavirus deoxyribonucleic acid with clinical outcome in early uterine cervical carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2005;29(6):528-36.

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Brasil - Atlas de mortalidade por câncer, 2011. [atualizada em 08/06/2012 e acesso em 29 de junho de 2012]. Disponível na Internet: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011: 122p. [Acesso em junho de 2012]. Disponível na Internet: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011: 104p. [Acesso em abril de 2012]. Disponível na Internet: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Diretrizes_rastreamento_cancer_colo_uteropdf

- Ishikawa H, Mitsuhashi N, Sakurai H, Maebayashi K, Niibe H. The effects of p53 status and human papillomavirus infection on the clinical outcome of patients with stage IIIB cervical carcinoma treated with radiation therapy alone. *Cancer*. 2001 Jan 1;91(1):80-9.
- Jascur T, Brickner H, Salles-Passador I, Barbier V, El Khissiin A, Smith B, et al. Regulation of p21^{WAF1/CIP1} stability by WIS p39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell*. 2005 Jan 21;17(2):237-49.
- Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res* 2009 Sep;130(3):286-95.
- Jee SH, Lee JE, Park JS. Polymorphism of codon 72 of p53 and environmental factors in the development of cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003 Jan;80(1):69-70.
- Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004 Jun;85(3):301-8.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- Jiang P, Liu J, Zeng X, Li W, Tang J. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Mar;197(2):174-8.
- Johnson GG, Sherrington PD, Carter A, Lin K, Liloglou T, Field JK, et al. A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):5210-7.
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Quarforth-Tubbin P, Pontén J, Adami HO, et al. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998 Dec 10;396(6711):531.
- Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, Ustav E, Ustav M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog* [periódico na Internet]. 2009 Apr [acesso em 2011 Oct];5(4):[16 p.]. Disponível em: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000397>
- Khunamornpong S, Siriaunkgul S, Manusirivithaya S, Settakorn J, Srisomboon J, Ponjaroen J, et al. Prognostic value of p53 expression in early stage cervical carcinoma treated by surgery. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008 Jan-Mar;9(1):48-52.
- Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, et al. Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. *Cancer*. 2000 May 1;88(9):2082-91.

- Kim JW, Roh JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Polymorphism of TP53 codon 72 and risk of cervical cancer among Korean women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Jan;184(2):55-8.
- Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 2005 Oct 31;46(5):597-613.
- Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*. 2000 Apr;82(7):1332-8.
- Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Benner A, von Knebel Doeberitz M. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. *J Mol Med (Berl)*. 1999 Feb;77(2):299-302.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2002 Nov;26(11):1389-99.
- Klug SJ, Wilmutte R, Santos C, Almonte M, Herrero R, Guerrero I, et al. TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Sep;10(9):1009-12.
- Klug SJ, Ressing M, Koenig J, Brenna SM, Ciotti M, Das BR, et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol*. 2009 Aug;10(8):772-84.
- Klumb EM, Pinto AC, Jesus GR, Araujo M Jr, Jascone L, Gayer CR, et al. Are women with lupus at higher risk of HPV infection? *Lupus*. 2010 Nov;19(13):1485-91.
- Konishi R, Sakatani S, Kimihiro K, Suzuki, K. Polymorphisms of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor and malignant skin tumors. *J Derm Sci*. 2000 Dec;24(3):177-83.
- Koshiol J, Hildesheim A, Gonzalez P, Bratti MC, Porras C, Schiffman M, et al. Common genetic variation in TP53 and risk of human papillomavirus persistence and progression to CIN3/cancer revisited. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 May;18(5):1631-7.
- Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 codon 73 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Jan;13(1):11-22.
- Koushik A, Ghosh A, Duarte-Franco E, Forest P, Voyer H, Matlashewski G, et al. The p53 codon 73 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: *Cancer Detect Prev*. 2005;29(4):307-16.
- Krambeck WM, Cadidé RM, Dalmarco EM, de Cordova CM. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008;35(3):175-8.

Kumar D, Verma M. Molecular markers of cervical squamous cell carcinoma. *CME J Gynecol Oncol*. 2006;11:41-60.

Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Kjellevoid KH, Fiane B, Lovslett K, et al. Ki-67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol*. 2004;26(1-2):13-20.

Kruse AJ, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell*. 2008;133(5):930-1.

Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time and temperature on DNA yield and quality. *Bioch Genetics*. 1993 Aug;31(7-8):321-8.

Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene*. 1993 Jun;8(6):1703-5.

Lee JE, Lee SJ, Namkoong SE, Um SJ, Sull JW, Jee SH, et al. Gene-gene and gene-environmental interactions of p53, p21, and IRF-1 polymorphisms in Korean women with cervix cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2004 Jan-Feb;14(1): 118-25.

Lee JM, Shun CT, Wu MT, Chen YY, Yang SY, Hung HI, et al. The associations of p53 overexpression with p53 codon 73 genetic polymorphism in esophageal cancer. *Mutat Res*. 2006 Feb 22;594(1-2):181-8.

Lee SA, Kim JW, Roh JW, Choi JY, Lee KM, Yoo KY, et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, p21, p53 and HPV infection with cervical cancer in Korean women. *Gynecol Oncol*. 2004 Apr; 93(1):14-8.

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):749-58.

Li G, Liu Z, Sturgis EM, Shi Q, Chamberlain RM, Spitz MR, et al. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 2005 Sep; 26(9):1596-602.

Liang CW, Lin MC, Hsiao CH, Lin YT, Kuo KT. Papillary squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: human papillomavirus-dependent changes in cell cycle expression and cytologic features. *Hum Pathol*. 2010 Mar;41(3):326-35.

Lie AK, Skarsvåg S, Skomedal H, Haugen OA, Holm R. Expression of p53, MDM2, and p21 proteins in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and relationship to human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Pathol*. 1999 Jan;18(1):5-11.

Lima Júnior SF, Fernandes MCM, Heráclio SA, Souza PRE, Maia MMD. Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil / Prevalence of human papillomavirus genotypes: comparison between three detection methods in patients of Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011 Oct;33(10):315-20.

Little L, Stewart CJR. Cyclin D1 immunoreactivity in normal endocervix and diagnostic value in reactive and neoplastic endocervical lesions. *Mod Pathol*. 2010 Apr;23(4):611-8.

Liu F, Li B, Wei Y, Chen X, Ma Y, Yan L, et al. p21 codon 31 polymorphism associated with cancer among white people: evidence from a meta-analysis involving 78074 subjects. *Mutagenesis*. 2011 Jul;26(4):513-21.

Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Mar 29;91(7):2436-40.

Lu H, Gan M, Zhang G, Zhou T, Yan M, Wang S. Expression of surviving, caspase-3 and p53 in cervical cancer assessed by tissue microarray: correlation with clinicopathology and prognosis. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(6):662-6.

Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S. Expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ in adenocarcinoma of uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer*. 1998 Jun 15;82(12):2409-17.

Ma H, Zhou Z, Wei S, Wei Q. Association between p21 Ser31Arg polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Chin J Cancer*. 2011 Apr;30(4):254-63.

Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wipf GC, et al. The p53 Arg72Pro Polymorphism, Human Papillomavirus, and Invasive Squamous Cell Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Feb;9(2):225-7.

Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, et al. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer*. 2000 Aug 15;87(4):528-33.

Malik MA, Sharma K, Goel S, Zargar SA, Mittal B. Association of TP53 intron 3, 16 bp duplication polymorphism with esophageal and gastric cancer susceptibility in Kashmir Valley. *Oncol Res*. 2011;19(3-4):165-9.

Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*. 1987 Feb;7(2):961-3.

McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomavirus. *Virus Res*. 2009 Aug;143(2):195-208.

Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B, El-Bayoumy K, Hoffmann D, Wang X, et al. Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett*. 1999 Nov 15;146(2):127-34.

Menendez D, Inga A, Resnick MA. The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes. *Mol Cell Biol*. 2006 Mar;26(6):2297-308.

- Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus, Riethdorf L, Löning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch.* 2001 Jul;439(1):55-61.
- Min-min H, Ming-rong X, Ze-yi C, Kai-xuan Y, Zhi-lin S. Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Nov-Dec;16(6):2004-8.
- Mitra S, Misra C, Singh RK, Panda CK, Roychoudhury S. Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India. *J Clin Pathol.* 2005 Jan;58(1):26-31.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug;10(8):550-60.
- Moreno V, Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Gonzalez LC, Tafur L, et al. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 Jul-Aug;4(5):459-67.
- Mousses S, Ozcelik H, Lee PD, Malkin D, Bull SB, Andrulis IL. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum Mol Genet.* 1995 Jun;4(6):1089-92.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004 Nov;78(21):11451-60.
- Muñoz, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000 Oct;19(1,2):1-5.
- Muñoz N, Bosh FX, de SanJosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb;348(6):518-27.
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004 Aug 20;111(2):278-85.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24(Suppl 3):1-10.
- Nagpal JK, Sahni S, Das BR. p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to development of human papilloma virus-associated cervical cancer in Indian women. *Eur J Clin Invest.* 2002 Dec;32(12):943-8.
- NCBI-GENBANK National Center for Biotechnology Information, CDKN1A cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) [*Homo sapiens*] [homepage na Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [atualizado 2012 Aug 26] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1026>

NCBI-GENBANK National Center for Biotechnology Information, TP53 tumor protein p53 [*Homo sapiens*] [homepage na Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [atualizado 2012 Aug 29] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>

Ngan HY, Tsao SW, Liu SS, Stanley M. Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer--a study at protein, RNA and DNA levels. *Genitourin Med.* 1997 Feb;73(1):54-8.

Ngan HY, Liu VW, Liu SS. Risk of cervical cancer is not increased in Chinese carrying homozygous arginine at codon 72 of p53. *Br J Cancer.* 1999 Aug;80(11):1828-9.

Nichols GE, Williams ME, Gaffey MJ, Stoler MH. Cyclin D1 gene expression in human cervical neoplasia. *Mod Pathol.* 1996 Apr;9(4):418-25.

Noronha V, Mello W, Villa LL, Brito A, Macedo R Bisi F, et al. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999 May-Jun;32(3):235-40.

Nunobiki O, Ueda M, Toji E, Yamamoto M, Akashi K, Sato N, et al. Genetic polymorphism of cancer susceptibility genes and HPV infection in cervical carcinogenesis. *Pathol Res Intern [periódico na Internet].* 2011 May 31 [acesso em 2011 Oct];2011:[8 p.] Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/pri/2011/364069/>

Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: Signalling towards p21^{cip1/waf1}. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(7-8):1367-74.

Ojeda JM, Ampuero S, Rojas P, Prado R, Allende JE, Barton SA, et al. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer. *Biol Res.* 2003;36(2):279-283.

Oliveira S, Sousa H, Santos AM, Pinto D, Pinto-Correia AL, Fontoura D, et al. The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a portuguese population: a study in exfoliated cervical cells. *J Med Virol.* 2008 Mar;80(3):424-9.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat.* 2002 Jun;19(6):607-14.

OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man, MIM Number: 116899 [homepage na Internet]. Baltimore, MD: Johns Hopkins University; c1994 [atualizada em 2012 May 8; acesso em 2012 Aug 9]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/116899>

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, MIM Number: 191170 [homepage na Internet]. Baltimore, MD: Johns Hopkins University, c1986 [atualizada em 2012 Jul 25; acesso em Aug 9]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/191170>

Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, et al. p16^{INK4A} immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol*. 2009 Jan;28(1):90-7.

Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Human Pathol*. 2011 Jul;42(7):1007-12.

Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, et al. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem*. 2011 May 20;286(20):18251-60.

Øvestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, Malpica A, Munk AC, Janssen EA, et al. The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *J Clin Pathol* 2011 Apr;64(4):303-7.

Paesi S, Serafini EP, Barea F, Madi SR, Echeverrigaray S. High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil. *J Med Virol*. 2009 Jul;81(7):1270-5.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001 Oct;37(Suppl 8):S4-66.

Payton M, Coats S. Cyclin E2, the cycle continues. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Apr;34(4):315-20.

Pegoraro RJ, Rom L, Lanning PA, Moodley M, Naiker S, Moodley J. p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in South African women. *Int J Gynecol Cancer*. 2002 Jul-Aug;12(4):383-8.

Pereira CRN, Rosa MLG, Vasconcelos GALBM, Faria PC, Cavalcanti SM, Oliveira LH. Human Papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 May-Jun;17(3):651-60.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):622-9 [atualizado em novembro de 2010; acesso em 2012 Mai 05]. Disponível em: <http://www-p53.iarc.fr/>

Photo Researches, Sciencesource Naturesource [base de dados na Internet]. New York: Photo Researches, Inc. 2012. [acesso em 2012 Mar 15]. Disponível em: <http://db2.photoresearchers.com/preview/BQ2724.html>

Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*. 2006 Mar 13;25(11):1602-11.

Piña-Sánchez P, Hernández-Hernández DM, Taja-Chayeb L, Cerda-Flores RM, González-Herrera AL, Rodea-Avila C, et al. Polymorphism in exon 4 of *TP53* gene

associated to HPV 16 and 18 in Mexican women with cervical cancer. *Med Oncol*. 2011 Dec;28(4):1507-13.

Pires AR, Andreiuolo FdaM, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol [periódico na Internet]*. 2006 Jul 26 [acesso em 2010 Sep];1(14):[5 p.]. Disponível em: <http://www.diagnosticpathology.org/content/pdf/1746-1596-1-14.pdf>

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Mar;98(2):181-4.

Rajaram S, Gupta G, Agarwal S, Goel N, Singh KC. High-risk human papillomavirus, tumor suppressor protein p53 and mitomycin-C in invasive squamous cell carcinoma cervix. *Indian J Cancer*. 2006 Oct-Dec;43(4):156-62.

Redman R, Rufforny I, Liu C, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16(INK4a) in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 May;132(5):795-9.

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):402-12.

Robles AJ, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol [periódico na Internet]*. 2010 Mar [acesso em 2011 Sep];2(3):[aproximadamente 16 p.]. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/3/a001016.full.pdf+html>

Roh JW, Kim MH, Kim JW, Park N, Song Y, Kang S, *et al*. Polymorphisms in codon 31 of p21 and cervical cancer susceptibility in Korean women. *Cancer Lett*. 2001 Apr 10;165(1):59-62.

Roh JW, Kim BK, Lee CH, Kim J, Chung HH, Kim JW, *et al*. p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. *Oncol Res*. 2010;18(9):453-9.

Rosa MI, Fachel JMG, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-617.e7.

Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzetti MC, Silva FR, Silva BR. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad Saúde Pública*. 2009 Maio; 25(5):953-964.

Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet*. 1998 Sep; 352(9131):871-2.

Roura E, Iftner T, Vidart JA, Krüger Kjaer S, Bosch FX, Muñoz N, et al. Predictors of human papillomavirus infection in women undergoing routine cervical cancer screening in Spain: the CLEOPATRE study. *BMC Infect Dis* [periódico na Internet]. 2012 Jun 26 [acesso em 2012 Jul];12(1):145 [25 p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-12-145.pdf>

Samarawardana P, Singh M, Shrover KR. Dual stain immunohistochemical localization of p16INK4a and Ki-67: a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Dec;19(6):514-8.

Santopietro R, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, et al. Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jul;15(7):1250-6.

Santos AM, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 Jun;159(2):143-7.

Santos AM, Sousa H, Pinto D, Portela C, Pereira D, Catarino R, et al. Linking TP53 codon 72 and p21nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2006 May;42(7):958-63.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):495-505.

Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol*. 2003 Feb;13(1):59-67.

Schwarz JK, Lewis JS Jr, Pfeifer J, Huettner P, Grigsby P. Prognostic significance of p16 expression in advanced cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*. 2012 Sep 1;84(1):153-7.

Senapathy JG, Umadevi P, Kannika PS. The present scenario of cervical cancer control and HPV epidemiology in India: an outline. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(5):1107-15.

Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):403-10.

Shi H, Tan SJ, Zhong H, Hu W, Levine A, Xiao CJ, et al. Winter temperature and UV are tightly linked to genetic changes in the p53 tumor suppressor pathway in Eastern Asia. *Am J Hum Genet*. 2009 Apr;84(4):534-41.

Shin MK, Balsitis S, Brake T, Lambert PF. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21^{Cip1} in cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5656-63.

Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, et al. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood.* 1994 Dec;84(11):3781-4.

Silva BV, Horta BAC, Bicca de Alencastro R, Pinto AC. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim Nova* [periódico na Internet]. 2009 Feb 2 [acesso em 2011 Jul];32(2):453-62. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n2/v32n2a32.pdf>

Silva RE, Arruda JT, Rodrigues FW, Moura KK. Primary open angle glaucoma was not found to be associated with p53 codon 72 polymorphism in a Brazilian cohort. *Genet Mol Res.* 2009;8(1):268-72.

Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1999 May;73(2):223-8.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high grade lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007 Aug 1;121(3):621-32.

Smith MA, Silva MD, Cenderoglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Labio RW, et al. TP53 codon 72 polymorphism as a risk factor for cardiovascular disease in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Nov; 40(11):1465-72.

Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.* 2006 Jan;208(2):152-64.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002 Apr 24;287(16):2114-9.

Souza H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Medicine.* 2007 Nov;20(5):731-41.

Souza H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port.* 2011 Jan-Feb;24(1):127:34.

Sowjanya AP, Jain M, Poli UR, Padma S, Das M, Shah KV, et al. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. *BMC Infect Dis* [periódico na Internet]. 2005 Dec 22 [acesso em 2010 Oct];5(116):[7 p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-5-116.pdf>

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. *J Pathol.* 2003 Jun;200(2):137-48.

Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007 Dec;35:1456-60.

Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol.* 2008 May;109(2 Suppl):S15-21.

Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol.* 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2-5.

St Jude Children's Research Hospital [homepage na Internet]. Memphis: St. Jude Children's Research Hospital, Inc.; [atualizada em 2010 Oct; acesso em 2012 Mar].

Disponível em:

<http://www.stjude.org/stjude/v/index.jsp?vgnextoid=ed17ca796f775310VgnVCM100000290115acRCRD&vgnnextchannel=d645ff98a6775310VgnVCM100000290115acRCRD>

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998 May;393(6682):229-34.

Su L, Sai Y, Fan R, Thurston SW, Miller DP, Zhou W, et al. p53 (codon 72) and p21 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21. *Lung Cancer.* 2003 Jun;40(3):259-66.

Sun Y, Keshava C, Sharp DS, Weston A, McCanlies EC. DNA sequence variants of p53: cancer and aging. *Am J Hum Genet.* 1999 Dec;65(6):1779-82.

Suzuki Y, Nakano T, Kato S, Ohno T, Tsujii H, Oka K. Immunohistochemical study of cell cycle-associated proteins in adenocarcinoma of the uterine cervix treated with radiotherapy alone: P53 status has a strong impact on prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Sep 1;60(1):231-6.

Tachezy R, Mikysková I, Saláková M, Van Ranst M. Correlation between human papillomavirus-associated cervical cancer and p53 codon 72 arginine/proline polymorphism. *Hum Genet.* 1999 Dec;105(6):564-6.

Tan GC, Sharifah NA, Shiran MS, Salwati S, Hatta AZ, Paul-Ng HO. Utility of Ki-67 and p53 in distinguishing cervical intraepithelial neoplasia 3 from squamous cell carcinoma of the cervix. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008 Oct-Dec;9(4):781-4.

Tan XL, Nieters A, Hoffmeister M, Beckmann L, Brenner H, Chang-Claude J. Genetic polymorphisms in TP53 nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of colorectal cancer: evidence for gene-environment interaction? *Pharmacogenet Genomics.* 2007 Aug;17:639-45.

Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*. 2008 May 16;133(4):612-26.

Tenti P, Vesentini N, Rondo Spauolo M, Zappatore R, Migliora P, Carnevali L, et al. p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Apr; 9(4):435-8.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1092-100.

Thun MJ, DeLancey JO, Center MC, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):100-10.

Thurrow HS, Haack R, Hartwig FP, Oliveira IO, Dellagostin OA, Gidante DP, et al. TP53 gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a Brazilian cohort. *J Biosci*. 2011 Dec;36(5):823-31.

Tian Q, Lu W, Chen H, Ye F, Xie X. The nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in codon 31 of p21 gene and the susceptibility to cervical cancer in Chinese women. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Aug;19(6):1011-4.

Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts GC, et al. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Aug;97(2):223-30.

Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypothesis, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):909-23.

Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo S, Lopez G, Vega X, Maldonado Reyes CF, et al. A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from Ecuadorian women. *J Med Virol*. 2008 Nov;80(11):1959-65.

Tosun G, Sendag F, Zeybek B, Cosan Terek M, Guven C, Zekiogly O, et al. Immunohistochemical expressions of p16 and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia and in benign cervical tissue. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(6):627-31.

Trimble CL, Peng S, Thoburn C, Kos F, Wu TC. Naturally occurring systemic immune response to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 May;59(5):799-803.

Tronccone G, Martinez JC, Palombini L, De Rosa G, Mugica C, Rodriguez JA, et al. Immunohistochemical expression of mdm2 and p21WAF1 in invasive cervical cancer: correlation with p53 protein and high risk HPV infection. *J Clin Pathol*. 1998 Oct;51(10):754-60.

Trushin N, Alam S, El-Bayoumy K, Krzeminski J, Amin SG, Gullett J, et al. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by human keratinocytes infected with

high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes. *J Carcinog* [periódico na Internet]. 2012 Jan 27 [acesso em 2012 Aug];11(1);[aproximadamente 9 p.]. Disponível em: http://www.carcinogenesis.com/temp/JCarcinog1111-8190706_224507.pdf

Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med*. 1999;50:401-23.
Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of G₁ cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*. 2003 Dec;91(3):476-85.

Uazwebpath. Cervical intraepithelial neoplasia, CIN III (severe displasia), histology [base de dados na Internet]. Mexico: Universidad Autónoma de Zacatecas. [acesso em 2012 Mar 18]. Disponível em: http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_18/c18_cin3.htm

Ueda M, Hung YC, Terai Y, Saito J, Nunobiki O, Noda S, et al. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2005 Mar;96(3):736-40.

Ueda M, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Takehara M, Yamaguchi H, et al. Germline polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer. *Gynecol Oncol*. 2006 Jan;100(1):173-8.

Valentin MD, Canalle R, Queiroz R de P, Tone LG. Frequency of polymorphisms and protein expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) in central nervous system tumors. *São Paulo Med J*. 2009 Sep;127(5):288-94.

Vassalo J, Derchain SF, Pinto GA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Andrade LA. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000 Oct;71(1):45-8.

Veroux M, Corona D, Scalia G, Garozzo V, Gagliano M, Giuffrida G, et al. Surveillance of human papilloma virus infection and cervical cancer in kidney transplant recipients: preliminary data. *Transplant Proc*. 2009 May;41(4):1191-4.

Vesco KK, MPH, Whitlock EP, Eder M, Burda BU, Senger CA, Lutz K. Risk factors and other epidemiologic considerations for cervical cancer screening: a narrative review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2011 Nov 15;155(10):698-705.

Vieira JO, da Silva ID, Higo PE, Nogueira-de-Souza NC, Gebrim LH. Study of p53 codon 72 polymorphism in patients with breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008;29(4):364-7.

Vijayalakshmi N, Selvaluxmi G, Majhi U, Rajkumar T. Alterations found in p16/Rb/cyclin D1 pathway in the dysplastic and malignant cervical epithelium. *Oncol Res* 2007;16(11):527-33.

- Vinyuvat S, Karalak A, Suthipintawong C, Tungsinmunkong K, Kleebkaow P, Trivijitsilp P, et al. Interobserver reproducibility in determining p16 overexpression in cervical lesions: use of a combined scoring method. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008 Oct-Dec;9(4):653-7.
- Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell*. 1992 Aug;70(4):523-6.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr;8(4):275-83.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594-604.
- Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet*. 2003 Jun 28;361:2217-25.
- Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang-Claude J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics*. 2002 Apr;12:269-72.
- WebPath®. The Internet Pathology Laboratory for Medical Education [base de dados na Internet]. Savannah (Georgia): The University of Utah Eccles Health Sciences Library. c 1994 [acesso em 2012 Mar 15]. Disponível em: <http://library.med.utah.edu/WebPath/FEMHTML/FEM003.html>
- Werness BA, Wang HQ, Chance J, Goldstein DJ. p53-independent expression of p21 in preinvasive and invasive squamous neoplasia of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 1997 Jun;10(6):578-84.
- Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Apr 1;101(7):475-87.
- Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009 Feb;9(2):95-107.
- WHO / ICO information centre on HPV and cervical cancer. Human papillomavirus and related cancers, Indicator guidelines. 3rd edition, 2010 Jun 22 [acesso em 2011 Oct]. Disponível na internet: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/methodologies.pdf>
- Wootipoom V, Lekhyananda N, Phungrassami T, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*. 2004 Sep;94(3):636-42.
- Wright TC, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical cancer screening. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):489-90.
- Wu MT, Liu CL, Ho CK, Wu TN. Genetic polymorphism of p53 and XRCC1 in cervical intraepithelial neoplasm in Taiwanese women. *J Formos Med Assoc*. 2004 May;103(5):337-43.

Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, et al. p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst.* 2002 May 1;94(9):681-90.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM . Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997 Mar;71(3):2463-72.

Yamashita H, Murakami N, Asari T, Okuma K, Ohtomo K, Nakagawa K. Correlation among six biologic factors (p53, p21(WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Jul 15;74(4):1165-72.

Ye F, Zhang J, Cheng Q, Shen J, Chen H. p53 codon 72 polymorphism is associated with occurrence of cervical carcinoma in the Chinese population. *Cancer Lett.* 2010 Jan 1;287(1):117-21

Zapka JG, Taplin SH, Solberg LI, Manos MM. A framework for improving the quality of cancer care: The case of breast and cervical cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Jan;12(1):4-13.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet.* 1999 Jul 17;354(9174):218-9.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):608-11.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.

APÊNDICE A. Questionário aplicado a todas as participantes deste estudo

COLO DE ÚTERO: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS DE HPV E POLIMORFISMOS DOS GENES *TP53* E *P21* EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS

1. Data da Entrevista: | | | / | | | / | 2 | 0 | 0 | | |

2. N° do Prontuário: | | | | | | | | | | | | |

3. **Nome** **Completo:**

4. **Endereço:** _____

Bairro: _____

Cidade: _____ CEP: _____

5. **Telefone Residencial/Celular:** | | | | | | - | | | | | | / | | | | | | - | | | | | |

6. **Em que dia, mês e ano a senhora nasceu?**

| | | | / | | | / | | | | | | 99/99/9999 | | | NS/NR
Dia Mês Ano

7. **Em que local a senhora nasceu?**

a. **País:** _____ | | | | (codificação posterior)

b. **Cidade/Estado:** _____ | | | | (codificação posterior)

8. **Há quantos anos a senhora mora na cidade do Rio de Janeiro?**

| | | | anos 99 | | | NS/NR

9. **Qual é a situação conjugal atual da senhora?**

1 | | | Solteira 4 | | | Viúva

2 | | | Casada ou vive com alguém na mesma casa 9 | | | NS/NR

3 | | | Separada/Desquitada/Divorciada

10. **Quantas vezes a senhora se casou ou viveu com alguém?**

1 | | | 1 3 | | | 3 9 | | | NS/NR

2 | | | 2 4 | | | mais de 3

11. **Qual o tempo do relacionamento mais duradouro?**

| | | | anos 99 | | | NS/NR

12. **Qual o seu grau de escolaridade?**

1 | | | nunca estudou formalmente

2 | | | 1° grau/Ensino fundamental - incompleto

3 | | | 1° grau/Ensino fundamental - completo

4 | | | 2° grau/Ensino médio - incompleto

5 | | | 2° grau/Ensino médio - completo

6 | | | Superior (3° grau) - incompleto

7 | | | Superior (3° grau) - completo ou mais

2 |__| Parda

4 |__| Indígena

9 |__| NS/NR

17. Na sua opinião, qual é a cor ou raça do seu pai? (Ascendentes paternos)

1 |__| Branca

3 |__| Negra

5 |__| Amarela

2 |__| Parda

4 |__| Indígena

9 |__| NS/NR

18. Algum médico já disse que a senhora tem ou teve algumas das doenças que vou citar?

	Quando			
a. sífilis	1 __ Sim	2 __	__	Não
b. gonorréia	1 __ Sim	2 __	__	Não
c. Clamydia/Tricomoníase	1 __ Sim	2 __	__	Não
d. verruga genital/condiloma (HPV)	1 __ Sim	2 __	__	Não
e. herpes	1 __ Sim	2 __	__	Não
f. AIDS	1 __ Sim	2 __	__	Não
g. câncer de mama	1 __ Sim	2 __	__	Não
h. câncer de colo do útero	1 __ Sim	2 __	__	Não
i. câncer de ovário	1 __ Sim	2 __	__	Não
j. câncer de endométrio	1 __ Sim	2 __	__	Não
l. lupus	1 __ Sim	2 __	__	Não
m. outro tipo de câncer	1 __ Sim	2 __	__	Não

Qual? _____

19. Mencione se alguns de seus familiares (PAIS-1, IRMÃOS-2, FILHOS-3 AVÓS-4, TIOS-5 OU PRIMOS-6) têm ou já tiveram alguma das seguintes doenças. (M-materno ou P-paterno)

	Quem?		
a. câncer de mama	1 __ Sim	2 __ Não	_____ -
b. câncer de colo do útero	1 __ Sim	2 __ Não	_____ -
c. câncer de ovário	1 __ Sim	2 __ Não	_____ -
d. câncer de endométrio	1 __ Sim	2 __ Não	_____ -
f. lupus	1 __ Sim	2 __ Não	_____ -

e. outro tipo de câncer 1 | | Sim 2 | | Não _____ -

Qual? _____

20. A senhora já experimentou bebidas alcoólicas, mesmo que apenas alguns goles?

1 | | Sim 2 | | Não (*passe 23*) 9 | | NS/NR
(*passe 23*)

21. Quantos anos a senhora tinha quando experimentou bebidas alcoólicas pela primeira vez?

| | | anos 99 | | NS/NR

22. No último mês (últimas quatro semanas), a senhora consumiu alguma bebida alcoólica?

1 | | Sim 2 | | Não 9 | | NS/NR (*passe 23*)

23. No último mês (últimas quatro semanas), aproximadamente, em quantos dias, por semana ou por mês, a senhora consumiu bebida alcoólica?

1 | | | Dias por semanas 2 | | | Dias por mês 9 | | NS/NR
(*passe 23*)

24. Alguma vez a senhora já experimentou cigarros, mesmo uma ou duas tragadas?

1 | | Nunca (*passe 28*)

2 | | Sim - menos de 100 cigarros durante toda a vida (*passe 28*)

3 | | Sim - mais de 100 cigarros durante toda a vida

25. Quantos anos a senhora tinha quando começou a fumar cigarros, regularmente, quer dizer, pelo menos 1 cigarro por semana, mesmo que já tenha parado?

| | | anos 99 | | NS/NR

26. Quantos anos a senhora tinha quando parou de fumar cigarros?

1 | | Não parei (fumo atualmente)

2 | | | anos 99 | | NS/NR

27. Em média, quantos cigarros a senhora fuma ou fumava por dia? (1 maço = 20 cigarros)

1 | | | Cigarros por dia 99 | | NS/NR/Variável

28. Com que idade a senhora ficou menstruada pela primeira vez?

| | | anos 99 | | NS/NR

Perguntas sobre menopausa (1 ano sem sangramento). Sintomas característicos.

29. A senhora já parou de menstruar?

1 | | Sim, com que idade? | | | anos | | | meses 99 | | NS/NR

2 | | Não (*passe 31*)

1 Sim, **quantas vezes?** 99 NS/NR 2 Não

G

P (/ / / / / / / /) (anotar na seqüência: Ces, PN)

A (/ / / / / / / /) (anotar na seqüência: Pr, Es)

Exclusão de LES / Doença autoimune / Uso de imunossupressor

47. A senhora é portadora de doença reumática conhecida?

1 Sim 2 Não 9 NS/NR

48. A senhora apresenta alguma queixa reumática?

1 Sim 2 Não 9 NS/NR

49. A senhora apresenta ou já apresentou qualquer um desses sinais/sintomas que vou citar?

a. história familiar de doença autoimune	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
b. lesões na pele compatíveis com lúpus	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
c. fotosensibilidade	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
d. rash malar	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
e. lesões discóides	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
f. artralgia / artrite	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
g. derrame pleural	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
h. dor pelurítica	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
i. derrame pericárdico	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
j. anemia hemolítica	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
l. púrpura trombocitopênica imunológica	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
m. nefrite	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
n. FAN positivo	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
o. auto anticorpos	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não

É POSSÍVEL EXCLUIR O DIAGNÓSTICO DE LES? 1 Sim 2 Não

50. A senhora usa ou já usou algum imunossupressor?

1 Sim. Qual? _____ 2 Não 9 NS/NR

51. A senhora usa ou já usou qualquer um dos medicamentos que vou citar?

a. AZATIOPRINA	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
b. CICLOFOSFAMIDA	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
c. MICOFENOLATO MOFETIL	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
d. CICLOSPORINA	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não
e. METOTREXATO	1 <input type="checkbox"/> Sim	2 <input type="checkbox"/> Não

52. A senhora usa ou já usou cortisona?

1 Sim. Quando? _____ Motivo? _____
 2 Não
 9 NS/NR

OBSERVAÇÕES:

Doenças intercorrentes?

1 Sim. Qual? _____ 2 Não 9 NS/NR

ANEXO A. Avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IFF/FIOCRUZ

Andamento do projeto - CAAE - 0037.0.008.008-08				
Título do Projeto de Pesquisa				
Colo do útero: estudo da associação entre tipos de HPV e polimorfismos dos genes TP53 e p21(WAF1) em lesões pré-malignas e malignas				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	01/10/2008 12:13:06	12/02/2009 10:06:05		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	29/08/2008 15:49:40	Folha de Rosto	FR216048	(
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	01/10/2008 12:13:06	Folha de Rosto	0037.0.008.008-08	(
3 - Protocolo Pendente no CEP	28/11/2008 09:43:38	Folha de Rosto	0037/08	(
4 - Protocolo Aprovado no CEP	12/02/2009 10:06:04	Folha de Rosto	0037/08	(

Voltar

APROVADO

Válido Até 01/03/2012

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ
 Telefone: 2552-8491 / 2554-1700 r. 1730

[Assinatura]
 Vice Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

ANEXO B: Avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE/UERJ

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



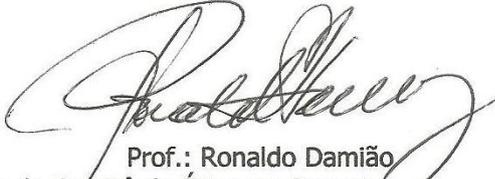
Rio de Janeiro, 04 de agosto de 2004

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Ronaldo Damião
Para: Prof^a. Jacyara M. B. Macedo
Prof^a. Heloisa C. R. Guillobel

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (909-CEP/HUPE) "COLO DE ÚTERO: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS DE HPV E POLIFORMISMOS DOS GENES P53 E P21 EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof.: Ronaldo Damião
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICE B: TCLE aplicado para as integrantes do grupo de casos




TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: COLO DE ÚTERO: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS DE HPV E POLIMORFISMOS DOS GENES *TP53* E *P21* EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS

Nº do Prontuário: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa do Instituto Fernandes Figueira (FIOCRUZ) e do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG/UERJ) que visa identificar fatores de risco e/ou modificadores de risco da infecção pelo HPV no desenvolvimento do câncer do colo do útero. Ao realizar este estudo, nosso grupo de pesquisa pretende melhorar o conhecimento sobre a infecção pelo HPV na população, e avaliar a importância ou papel das alterações genéticas encontradas nos genes *TP53* e *p21*, considerados protetores da formação de tumor (supressores tumorais), visando ações de prevenção e prognóstico do câncer do colo uterino.

O referido estudo será conduzido por médicos e pesquisadores dessas instituições e incluirá, além da realização de questionário com perguntas de caráter pessoal, a coleta de material do colo do útero, como realizado no exame preventivo ginecológico, e de uma amostra de seu sangue, da forma usualmente empregada nos laboratórios de análises clínicas.

O material do colo do útero será examinado no Laboratório de Anatomia Patológica - IFF/FIOCRUZ, para verificação de possíveis alterações celulares (exame histopatológico), e no Laboratório de Imunohistoquímica da Disciplina de Anatomia Patológica - FCM/UERJ, para avaliar expressão dos genes *TP53* e *p21*. No Laboratório de Biologia Molecular - IBRAG/UERJ, serão avaliados a presença e o tipo do HPV nas amostras cervicais, bem como o sangue coletado será devidamente processado visando sua utilização no estudo de polimorfismo genéticos. Todas as informações coletadas no questionário constituirão um banco de dados, que serão analisados juntamente com os dados clínicos e os resultados dos exames realizados, visando melhor compreensão da carcinogênese cervical.

Todo o material biológico coletado e processado fará parte de um banco de DNAs, cujas amostras serão codificadas e anônimas. Este banco ficará alocado no Laboratório de Biologia Molecular – IBRAG/UERJ, sob a responsabilidade da Profa. Jacyara (2587 6143). Este material poderá ser utilizado em estudos futuros desde que sejam mantidos os critérios do projeto atual.

É importante que você saiba que sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária e que você pode se recusar a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem que isto venha a causar qualquer prejuízo ao seu tratamento, o qual será realizado de acordo com a indicação médica e disponibilidades de recursos dessas instituições.

Este projeto foi submetido à avaliação dos Comitês de Ética e Pesquisa do IFF/FIOCRUZ e HUPE/UERJ, tendo sido aprovado sob o ponto de vista ético e estando em concordância com a resolução CNS nº 196/96, que regulamenta a realização de pesquisas envolvendo seres humanos. As informações obtidas na entrevista e os resultados dos exames serão utilizados pela equipe de pesquisadores envolvidos, mas seu nome não será revelado, ainda que informações sejam utilizadas para fins educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

Qualquer dúvida antes, durante ou após o estudo que guarde relação com este, poderá ser esclarecida pelos seus médicos assistentes do IFF/FIOCRUZ (Dr. Fábio ou Dra. Maria José – 25541728 ou 25541727), ou pelas equipes de pesquisa da UERJ (Profa. Jacyara – 25876143) e IFF/FIOCRUZ (Dra. Elyzabeth – 25541801).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Com base nos esclarecimentos que me foram dados acima, declaro que concordei em participar desta pesquisa e entendo que ao fazê-lo não terei nenhum custo diferente dos que já vinha tendo com o meu tratamento, bem como também não terei qualquer custo com os exames que porventura vierem a ser realizados.

Autorizo a utilização do material biológico em pesquisas futuras.

Não autorizo a utilização do material biológico em pesquisas futuras.

(Assinatura do Paciente)

_____/_____/_____
dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

APÊNDICE D: Análise de interação dos fatores de risco com os genótipos dos SNP estudados comparando os subgrupos LSIL vs HSIL+câncer.

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Fumo	Não	A1/A1	22	56	1,00	G/G	13	27	1,00	C/C	18	65	1,00
		A1/A2	11	20	0,71 (0,29-1,73)	C/G	16	31	0,93 (0,38-2,28)	C/A	15	18	0,33 (0,14-0,79)*
		A2/A2	1	6	2,36 (0,27-20,72)	C/C	5	23	2,21 (0,69-7,15)	A/A	2	1	0,14 (0,01-1,62)
		A1/A2+A2/A2	12	26	0,85 (0,37-1,98)	C/G+C/C	21	45	1,03 (0,44-2,39)	C/A+A/A	17	19	0,31 (0,13-0,71)*
	Sim	A1/A1	43	61	1,00	G/G	22	37	1,00	C/C	40	58	1,00
		A1/A2	15	26	1,22 (0,58-2,58)	C/G	28	37	0,79 (0,38-1,62)	C/A	18	30	1,17 (0,57-2,38)
		A2/A2	2	3	1,06 (0,17-6,60)	C/C	9	17	1,12 (0,43-2,95)	A/A	0	4	---
		A1/A2+A2/A2	17	29	1,20 (0,59-2,46)	C/G+C/C	17	29	0,98 (0,44-2,19)	C/A+A/A	18	34	1,30 (0,65-2,62)
História familiar de cancer	Não	A1/A1	28	61	1,00	G/G	15	33	1,00	C/C	25	65	1,00
		A1/A2	9	25	1,28 (0,53-3,08)	C/G	19	36	0,86 (0,38-1,97)	C/A	12	24	0,77 (0,33-1,77)
		A2/A2	2	5	1,15 (0,21-6,28)	C/C	5	22	2,00 (0,64-6,30)	A/A	2	4	0,77 (0,13-4,47)
		A1/A2+A2/A2	11	30	1,25 (0,55-2,85)	C/G+C/C	24	58	0,91 (0,42-1,97)	C/A+A/A	14	28	0,77 (0,35-1,70)
	Sim	A1/A1	37	56	1,00	G/G	20	31	1,00	C/C	33	58	1,00
		A1/A2	17	21	0,82 (0,38-1,75)	C/G	25	32	0,83 (0,38-1,78)	C/A	21	24	0,65 (0,31-1,34)
		A2/A2	1	4	2,64 (0,28-24,59)	C/C	9	18	1,29 (0,49-3,43)	A/A	0	1	---
		A1/A2+A2/A2	18	25	0,92 (0,44-1,91)	C/G+C/C	34	50	0,52 (0,52-2,15)	C/A+A/A	21	25	0,68 (0,33-1,39)
DST prévia	Não	A1/A1	33	65	1,00	G/G	16	36	1,00	C/C	28	70	1,00
		A1/A2	15	24	0,81 (0,38-1,75)	C/G	24	35	0,65 (0,30-1,42)	C/A	18	25	0,56 (0,26-1,17)
		A2/A2	1	4	2,03 (0,22-18,91)	C/C	8	23	1,28 (0,47-3,46)	A/A	1	2	0,80 (0,07-9,18)
		A1/A2+A2/A2	16	28	1,13 (0,54-2,37)	C/G+C/C	32	58	0,82 (0,38-1,73)	C/A+A/A	19	27	0,57 (0,27-1,18)
	Sim	A1/A1	32	51	1,00	G/G	19	28	1,00	C/C	30	51	1,00
		A1/A2	11	20	1,14 (0,48-2,69)	C/G	20	30	1,02 (0,45-2,29)	C/A	15	23	0,90 (0,41-1,99)
		A2/A2	2	5	1,57 (0,29-8,57)	C/C	6	17	1,92 (0,64-5,76)	A/A	1	2	1,18 (0,10-13,53)
		A1/A2+A2/A2	13	25	0,83 (0,37-1,85)	C/G+C/C	26	47	1,23 (0,58-2,61)	C/A+A/A	16	25	0,92 (0,42-1,99)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Número de parceiros	A1/A1	42	83	1,00	G/G	22	44	1,00	C/C	40	81	1,00	
	<5	A1/A2	17	26	0,77 (0,38-1,58)	C/G	28	45	0,80 (0,40-1,61)	C/A	19	35	0,91 (0,46-1,79)
	A2/A2	2	7	1,77 (0,35-8,90)	C/C	10	26	1,30 (0,53-3,17)	A/A	2	3	0,74 (0,12-4,61)	
	A1/A2+A2/A2	19	33	0,88 (0,45-1,73)	C/G+C/C	38	71	0,93 (0,49-1,78)	C/A+A/A	21	38	0,89 (0,46-1,72)	
	≥ 5	A1/A1	19	29	1,00	G/G	12	19	1,00	C/C	13	36	1,00
		A1/A2	8	17	1,39 (0,50-3,86)	C/G	12	20	1,05 (0,38-2,91)	C/A	14	11	0,28 (0,10-0,78)*
		A2/A2	0	2	---	C/C	3	10	2,11 (0,48-9,24)	A/A	0	2	---
		A1/A2+A2/A2	8	19	1,56 (0,57-4,28)	C/G+C/C	15	30	1,26 (0,49-3,27)	C/A+A/A	14	13	0,34 (0,13-0,90)*
	Gestações	A1/A1	58	106	1,00	G/G	33	58	1,00	C/C	53	113	1,00
		<5	A1/A2	25	39	0,85 (0,47-1,55)	C/G	38	58	0,87 (0,48-1,57)	C/A	30	41
A2/A2		3	8	1,46 (0,37-5,71)	C/C	14	37	1,50 (0,71-3,18)	A/A	2	3	0,70 (0,11-4,34)	
A1/A2+A2/A2		28	47	0,92 (0,52-1,62)	C/G+C/C	52	95	1,04 (0,60-1,79)	C/A+A/A	32	44	0,64 (0,37-1,13)	
≥ 5		A1/A1	7	12	1,00	G/G	2	7	1,00	C/C	5	11	1,00
		A1/A2	1	7	4,08 (0,41-40,46)	C/G	6	10	0,48 (0,07-3,09)	C/A	3	7	1,06 (0,19-5,90)
		A2/A2	0	1	---	C/C	0	3	---	A/A	0	2	---
		A1/A2+A2/A2	1	8	4,67 (0,48-45,57)	C/G+C/C	6	13	0,62 (0,10-3,92)	C/A+A/A	3	9	1,36 (0,25-7,32)
Partos		A1/A1	61	113	1,00	G/G	35	62	1,00	C/C	55	117	1,00
		<5	A1/A2	26	42	0,87 (0,49-1,56)	C/G	40	63	0,89 (0,50-1,58)	C/A	32	47
	A2/A2	3	8	1,44 (0,37-5,63)	C/C	14	38	1,53 (0,73-3,21)	A/A	2	3	0,71 (0,11-4,34)	
	A1/A2+A2/A2	29	50	0,93 (0,54-1,62)	C/G+C/C	54	101	1,06 (0,62-1,79)	C/A+A/A	34	50	0,69 (0,40-1,19)	
	≥ 5	A1/A1	4	5	1,00	G/G	0	3	1,00	C/C	3	7	1,00
		A1/A2	0	4	---	C/G	4	5	0,00	C/A	1	1	0,43 (0,02-9,36)
		A2/A2	0	1	---	C/C	0	2	1,00	A/A	0	2	---
		A1/A2+A2/A2	0	5	---	C/G+C/C	4	7	0,24 (0,01-5,76)	C/A+A/A	1	3	1,29 (0,09-17,97)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Método contraceptivo	Não	A1/A1	30	33	1,00	G/G	12	18	1,00	C/C	24	41	1,00
		A1/A2	10	17	1,55 (0,61-3,90)	C/G	18	23	0,85 (0,33-2,22)	C/A	16	14	0,51 (0,21-1,23)
		A2/A2	2	5	2,27 (0,41-12,60)	C/C	11	14	0,85 (0,29-2,49)	A/A	1	2	1,17 (0,10-13,60)
		A1/A2+A2/A2	12	22	1,67 (0,71-3,94)	C/G+C/C	29	37	0,85 (0,35-2,04)	C/A+A/A	17	16	0,55 (0,24-1,29)
	Sim	A1/A1	35	84	1,00	G/G	23	46	1,00	C/C	34	82	1,00
		A1/A2	16	29	0,76 (0,37-1,56)	C/G	26	45	0,87 (0,43-1,73)	C/A	17	34	0,83 (0,41-1,68)
		A2/A2	1	4	1,67 (0,18-15,45)	C/C	3	26	4,33 (1,19-15,83)*	A/A	1	3	1,24 (0,12-12,39)
		A1/A2+A2/A2	17	33	0,81 (0,40-1,64)	C/G+C/C	29	71	1,22 (0,63-2,37)	C/A+A/A	18	37	0,85 (0,43-1,70)
Sexarca	>16	A1/A1	23	35	1,00	G/G	12	20	1,00	C/C	15	48	1,00
		A1/A2	9	25	1,83 (0,72-4,61)	C/G	15	25	1,00 (0,38-2,61)	C/A	16	12	0,23 (0,09-0,60)*
		A2/A2	0	4	---	C/C	5	19	2,28 (0,67-7,70)	A/A	1	4	1,25 (0,13-12,06)
		A1/A2+A2/A2	9	29	2,12 (0,85-5,28)	C/G+C/C	20	44	1,32 (0,54-3,21)	C/A+A/A	17	16	0,29 (0,12-0,72)*
	≤16	A1/A1	42	84	1,00	G/G	23	45	1,00	C/C	43	76	1,00
		A1/A2	17	23	0,68 (0,33-1,40)	C/G	29	45	0,79 (0,40-1,57)	C/A	17	36	1,20 (0,60-2,38)
		A2/A2	3	5	0,83 (0,19-3,66)	C/C	9	22	1,25 (0,50-3,15)	A/A	1	1	1,57 (0,03-9,28)
		A1/A2+A2/A2	20	28	0,70 (0,35-1,39)	C/G+C/C	38	67	0,90 (0,47-1,71)	C/A+A/A	18	37	1,16 (0,59-2,29)
Menarca	>13	A1/A1	28	47	1,00	G/G	13	27	1,00	C/C	27	53	1,00
		A1/A2	8	23	1,71 (0,68-4,34)	C/G	19	29	0,73 (0,31-1,77)	C/A	12	19	0,81 (0,34-1,90)
		A2/A2	2	3	0,89 (0,14-5,68)	C/C	6	17	1,36 (0,44-4,27)	A/A	0	2	---
		A1/A2+A2/A2	10	26	1,55 (0,65-3,68)	C/G+C/C	25	46	0,89 (0,39-2,02)	C/A+A/A	12	21	0,89 (0,38-2,08)
	≤13	A1/A1	37	72	1,00	G/G	22	38	1,00	C/C	31	71	1,00
		A1/A2	18	25	0,71 (0,35-1,47)	C/G	25	41	0,95 (0,46-1,96)	C/A	21	29	0,60 (0,30-1,22)
		A2/A2	1	6	3,08 (0,36-26,57)	C/C	8	24	1,74 (0,67-4,52)	A/A	2	3	0,65 (0,10-4,12)
		A1/A2+A2/A2	19	31	0,84 (0,42-1,68)	C/G+C/C	33	65	1,14 (0,58-2,23)	C/A+A/A	23	32	0,61 (0,31-1,20)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	LSIL	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Etnia	Branca	A1/A1	31	39	1,00	G/G	16	22	1,00	C/C	30	36	1,00
		A1/A2	13	9	0,55 (0,21-1,45)	C/G	23	17	0,54 (0,22-1,32)	C/A	10	12	1,00 (0,38-2,64)
		A2/A2	0	2	---	C/C	4	11	2,00 (0,54-7,44)	A/A	2	1	0,42 (0,04-4,82)
	A1/A2+A2/A2		13	11	0,67 (0,26-1,71)	C/G+C/C	27	28	0,75 (0,33-1,74)	C/A+A/A	12	13	0,90 (0,36-2,27)
	Não Branca	A1/A1	34	78	1,00	G/G	19	42	1,00	C/C	28	86	1,00
		A1/A2	13	39	1,31 (0,62-2,76)	C/G	21	52	1,12 (0,53-2,35)	C/A	23	36	0,51 (0,26-1,00)
A2/A2		3	7	1,02 (0,25-4,17)	C/C	10	30	1,36 (0,55-3,33)	A/A	0	4	---	
A1/A2+A2/A2		16	46	1,25 (0,62-2,52)	C/G+C/C	31	82	1,20 (0,61-2,37)	C/A+A/A	23	40	0,57 (0,29-1,00)	
Educação formal	> Ensino Fund	A1/A1	18	36	1,00	G/G	10	18	1,00	C/C	13	44	1,00
		A1/A2	11	24	1,09 (0,44-2,71)	C/G	16	25	0,87 (0,32-2,35)	C/A	16	18	0,33 (0,13-0,83)*
		A2/A2	0	1	---	C/C	3	19	3,52 (0,83-14,89)	A/A	0	2	---
	A1/A2+A2/A2		11	25	1,14 (0,46-2,82)	C/G+C/C	19	44	1,29 (0,50-3,30)	C/A+A/A	16	20	0,37 (0,15-0,91)*
	≤ Ensino Fund	A1/A1	47	81	1,00	G/G	25	45	1,00	C/C	45	78	1,00
		A1/A2	15	24	0,93 (0,44-1,94)	C/G	28	45	0,89 (0,45-1,76)	C/A	17	30	1,02 (0,51-2,05)
A2/A2		3	8	1,55 (0,39-6,12)	C/C	11	22	1,11 (0,46-2,66)	A/A	2	3	0,87 (0,14-5,38)	
A1/A2+A2/A2		18	32	1,03 (0,52-2,04)	C/G+C/C	39	67	0,95 (0,51-1,79)	C/A+A/A	19	33	1,00 (0,51-1,96)	

*Teste de Fisher $p < 0,05$

APÊNDICE E: Análise de interação dos fatores de risco com os genótipos dos SNP estudados comparando o grupo controle vs subgrupo LSIL.

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Genótipo p53 72C>G			Genótipo p21 31C>A								
		Controle	LSIL	OR (IC 95%)	Controle	LSIL	OR (IC 95%)						
Fumo	Não	A1/A1	55	22	1,00	G/G	25	13	1,00	C/C	53	18	1,00
		A1/A2	21	11	1,31 (0,54-3,16)	C/G	42	16	0,73 (0,30-1,77)	C/A	32	15	1,38 (0,61-3,11)
		A2/A2	4	1	0,62 (0,07-5,91)	C/C	11	5	0,87 (0,25-3,06)	A/A	5	2	1,18 (0,21-6,61)
		A1/A2+A2/A2	25	12	1,20 (0,51-2,80)	C/G+C/C	53	21	0,76 (0,33-1,76)	C/A+A/A	37	17	1,35 (0,62-2,97)
	Sim	A1/A1	54	43	1,00	G/G	23	22	1,00	C/C	50	40	1,00
		A1/A2	19	15	0,99 (0,45-2,18)	C/G	38	28	0,77 (0,36-1,65)	C/A	33	18	0,68 (0,34-1,39)
		A2/A2	4	2	0,63 (0,11-3,59)	C/C	16	9	0,59 (0,22-1,61)	A/A	6	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	23	17	0,93 (0,44-1,95)	C/G+C/C	54	38	0,74 (0,36-1,51)	C/A+A/A	39	18	0,58 (0,29-1,16)
História familiar de câncer	Não	A1/A1	70	28	1,00	G/G	28	15	1,00	C/C	58	25	1,00
		A1/A2	18	9	1,25 (0,50-3,11)	C/G	48	19	0,74 (0,32-1,68)	C/A	32	12	0,66 (0,30-1,47)
		A2/A2	7	2	0,71 (0,14-3,65)	C/C	18	5	0,52 (0,16-1,68)	A/A	10	2	0,46 (0,09-2,27)
		A1/A2+A2/A2	25	11	1,10 (0,48-2,53)	C/G+C/C	66	24	0,68 (0,31-1,48)	C/A+A/A	52	14	0,62 (0,29-1,33)
	Sim	A1/A1	38	37	1,00	G/G	20	20	1,00	C/C	44	33	1,00
		A1/A2	21	17	0,83 (0,38-1,82)	C/G	30	25	0,83 (0,37-1,88)	C/A	22	21	1,27 (0,60-2,69)
		A2/A2	1	1	1,03 (0,06-17,03)	C/C	9	9	1,00 (0,33-3,04)	A/A	1	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	22	18	0,84 (0,39-1,82)	C/G+C/C	39	34	0,87 (0,40-1,89)	C/A+A/A	23	21	1,22 (0,58-2,56)
DST prévia	Não	A1/A1	85	33	1,00	G/G	36	16	1,00	C/C	79	28	1,00
		A1/A2	29	15	1,33 (0,63-2,80)	C/G	63	24	0,86 (0,40-1,82)	C/A	50	18	1,02 (0,51-2,03)
		A2/A2	6	1	0,43 (0,05-3,70)	C/C	21	8	0,86 (0,31-2,34)	A/A	9	1	0,31 (0,04-2,59)
		A1/A2+A2/A2	35	16	1,18 (0,58-2,41)	C/G+C/C	84	32	0,86 (0,42-1,75)	C/A+A/A	59	19	0,91 (0,46-1,78)
	Sim	A1/A1	24	32	1,00	G/G	12	19	1,00	C/C	24	30	1,00
		A1/A2	10	11	0,82 (0,30-2,26)	C/G	16	20	0,79 (0,30-2,10)	C/A	14	15	0,86 (0,35-2,12)
		A2/A2	2	2	0,75 (0,10-5,71)	C/C	6	6	0,63 (0,16-2,42)	A/A	2	1	0,40 (0,03-4,68)
		A1/A2+A2/A2	12	13	0,81 (0,32-2,09)	C/G+C/C	22	26	0,75 (0,30-1,87)	C/A+A/A	16	16	0,80 (0,33-1,92)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Controle	LSIL	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	Controle	LSIL	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	Controle	LSIL	OR (IC 95%)	
Número de parceiros	<5	A1/A1	89	42	1,00	G/G	39	22	1,00	C/C	85	40	1,00
		A1/A2	32	17	1,13 (0,56-2,25)	C/G	69	28	0,72 (0,36-1,42)	C/A	55	19	0,73 (0,39-1,40)
		A2/A2	7	2	0,61 (0,12-3,04)	C/C	20	10	0,89 (0,35-2,23)	A/A	9	2	0,47 (0,10-2,29)
		A1/A2+A2/A2	39	19	1,03 (0,53-2,00)	C/G+C/C	89	38	0,76 (0,40-1,44)	C/A+A/A	64	21	0,70 (0,38-1,30)
	≥ 5	A1/A1	20	19	1,00	G/G	9	12	1,00	C/C	18	13	1,00
		A1/A2	8	8	1,05 (0,33-3,37)	C/G	11	12	0,82 (0,25-2,69)	C/A	10	14	1,94 (0,66-5,71)
		A2/A2	1	0	0,00	C/C	7	3	0,32 (0,06-1,60)	A/A	2	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	9	8	0,94 (0,30-2,93)	C/G+C/C	18	15	0,62 (0,21-1,88)	C/A+A/A	12	14	1,62 (0,57-4,62)
Gestações	<5	A1/A1	101	58	1,00	G/G	44	33	1,00	C/C	98	53	1,00
		A1/A2	37	25	1,18 (0,64-2,15)	C/G	75	38	0,68 (0,37-1,23)	C/A	58	30	0,96 (0,55-1,66)
		A2/A2	8	3	0,65 (0,17-2,56)	C/C	26	14	0,72 (0,33-1,58)	A/A	10	2	0,37 (0,08-1,75)
		A1/A2+A2/A2	45	28	1,08 (0,61-1,92)	C/G+C/C	101	52	0,69 (0,39-1,20)	C/A+A/A	68	32	0,87 (0,51-1,49)
	≥ 5	A1/A1	8	7	1,00	G/G	4	2	1,00	C/C	5	5	1,00
		A1/A2	3	1	0,38 (0,03-4,55)	C/G	5	6	2,40 (0,30-19,04)	C/A	7	3	0,43 (0,07-2,68)
		A2/A2	0	0	---	C/C	1	0	0,00	A/A	1	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	3	1	0,38 (0,03-4,55)	C/G+C/C	6	6	2,00 (0,26-15,39)	C/A+A/A	8	3	0,38 (0,06-2,30)
Partos	<5	A1/A1	105	61	1,00	G/G	46	35	1,00	C/C	100	55	1,00
		A1/A2	40	26	1,12 (0,62-2,01)	C/G	78	40	0,67 (0,38-1,21)	C/A	63	32	0,92 (0,54-1,58)
		A2/A2	8	3	0,65 (0,17-2,52)	C/C	27	14	0,68 (0,31-1,49)	A/A	11	2	0,33 (0,07-1,55)
		A1/A2+A2/A2	48	29	1,04 (0,59-1,82)	C/G+C/C	105	54	0,68 (0,39-1,17)	C/A+A/A	74	34	0,84 (0,50-1,41)
	≥ 5	A1/A1	4	4	1,00	G/G	2	0	1,00	C/C	2	3	1,00
		A1/A2	0	0	---	C/G	2	4	---	C/A	2	1	0,33 (0,02-6,65)
		A2/A2	0	0	---	C/C	0	0	---	A/A	0	0	---
		A1/A2+A2/A2	0	0	---	C/G+C/C	2	4	---	C/A+A/A	2	1	0,33 (0,02-6,65)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Controle	LSIL	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	Controle	LSIL	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	Controle	LSIL	OR (IC 95%)	
Método contraceptivo	Não	A1/A1	22	30	1,00	G/G	12	12	1,00	C/C	16	24	1,00
		A1/A2	6	10	1,22 (0,39-3,87)	C/G	10	18	1,80 (0,59-5,48)	C/A	10	16	1,07 (0,39-2,93)
		A2/A2	1	2	1,47 (0,12-17,21)	C/C	5	11	2,20 (0,58-8,28)	A/A	3	1	0,22 (0,02-2,33)
		A1/A2+A2/A2	7	12	1,26 (0,42-3,71)	C/G+C/C	15	29	1,93 (0,70-5,33)	C/A+A/A	13	17	0,87 (0,33-2,28)
	Sim	A1/A1	87	35	1,00	G/G	36	23	1,00	C/C	87	34	1,00
		A1/A2	34	16	1,17 (0,57-2,38)	C/G	70	26	0,58 (0,29-1,16)	C/A	55	17	0,79 (0,40-1,55)
		A2/A2	7	1	0,36 (0,04-2,99)	C/C	22	3	0,21 (0,06-0,79)*	A/A	8	1	0,32 (0,04-2,65)
		A1/A2+A2/A2	41	17	1,03 (0,52-2,05)	C/G+C/C	92	29	0,49 (0,25-0,96)*	C/A+A/A	63	18	0,73 (0,38-1,41)
Sexarca	>16	A1/A1	30	23	1,00	G/G	11	12	1,00	C/C	28	15	1,00
		A1/A2	16	9	0,73 (0,28-1,96)	C/G	24	15	0,57 (0,20-1,62)	C/A	21	16	1,42 (0,58-3,51)
		A2/A2	1	0	0,00	C/C	9	5	0,51 (0,13-2,00)	A/A	1	1	1,87 (0,11-32,01)
		A1/A2+A2/A2	17	9	0,69 (0,26-1,82)	C/G+C/C	33	20	0,56 (0,21-1,49)	C/A+A/A	22	17	1,44 (0,59-3,52)
	≤16	A1/A1	92	42	1,00	G/G	48	23	1,00	C/C	75	43	1,00
		A1/A2	30	17	1,24 (0,62-2,49)	C/G	59	29	1,03 (0,53-2,00)	C/A	44	17	0,67 (0,34-1,32)
		A2/A2	8	3	0,82 (0,21-3,25)	C/C	24	9	0,78 (0,31-1,95)	A/A	10	1	0,17 (0,02-1,41)
		A1/A2+A2/A2	38	20	1,15 (0,60-2,22)	C/G+C/C	83	38	0,96 (0,51-1,79)	C/A+A/A	54	18	0,58 (0,30-1,12)
Menarca	>13	A1/A1	59	28	1,00	G/G	24	13	1,00	C/C	51	27	1,00
		A1/A2	21	8	0,80 (0,32-2,04)	C/G	38	19	0,92 (0,39-2,21)	C/A	30	12	0,76 (0,33-1,71)
		A2/A2	1	2	4,21 (0,37-48,46)	C/C	17	6	0,65 (0,21-2,06)	A/A	3	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	22	10	0,96 (0,40-2,29)	C/G+C/C	55	25	0,84 (0,37-1,91)	C/A+A/A	33	12	0,69 (0,31-1,54)
	≤13	A1/A1	63	37	1,00	G/G	35	22	1,00	C/C	52	31	1,00
		A1/A2	25	18	1,23 (0,59-2,54)	C/G	45	25	0,88 (0,43-1,82)	C/A	35	21	1,01 (0,50-2,03)
		A2/A2	8	1	0,21 (0,03-1,77)	C/C	16	8	0,80 (0,29-2,17)	A/A	8	2	0,42 (0,08-2,10)
		A1/A2+A2/A2	33	19	0,98 (0,49-1,96)	C/G+C/C	61	33	0,86 (0,44-1,70)	C/A+A/A	43	23	0,90 (0,46-1,76)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Genótipo p53 72C>G			Genótipo p21 31C>A			OR (IC 95%)	Controle	LSIL	OR (IC 95%)		
		Controle	LSIL	OR (IC 95%)	Controle	LSIL	OR (IC 95%)						
Etnia	Branca	A1/A1	36	31	1,00	G/G	20	16	1,00	C/C	30	30	1,00
		A1/A2	12	13	1,26 (0,50-3,16)	C/G	21	23	1,37 (0,57-3,32)	C/A	16	10	0,63 (0,24-1,60)
		A2/A2	1	0	0,00	C/C	6	4	0,83 (0,20-3,47)	A/A	2	2	1,00 (0,13-7,57)
		A1/A2+A2/A2	13	13	1,16 (0,47-2,87)	C/G +C/C	27	27	1,25 (0,54-2,92)	C/A+A/A	18	12	0,67 (0,27-1,62)
	Não branca	A1/A1	86	34	1,00	G/G	39	19	1,00	C/C	73	28	1,00
		A1/A2	34	13	0,97 (0,46-2,05)	C/G	62	21	0,70 (0,33-1,46)	C/A	49	23	1,22 (0,63-2,37)
		A2/A2	8	3	0,95 (0,24-3,79)	C/C	27	10	0,76 (0,31-1,89)	A/A	9	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	42	16	0,96 (0,48-1,94)	C/G +C/C	89	31	0,72 (0,36-1,42)	C/A+A/A	58	23	1,03 (0,54-1,98)
Educação formal	> Ensino Fund	A1/A1	34	18	1,00	G/G	21	10	1,00	C/C	35	13	1,00
		A1/A2	18	11	1,15 (0,45-2,96)	C/G	23	16	1,46 (0,54-3,92)	C/A	13	16	3,31 (1,26-8,74)*
		A2/A2	2	0	0,00	C/C	9	3	0,70 (0,15-3,16)	A/A	6	0	0,00
		A1/A2+A2/A2	20	11	1,04 (0,41-2,63)	C/G +C/C	32	19	1,25 (0,48-3,20)	C/A+A/A	19	16	2,27 (0,90-5,69)
	≤ Ensino Fund	A1/A1	88	47	1,00	G/G	38	25	1,00	C/C	68	45	1,00
		A1/A2	28	15	1,00 (0,49-2,06)	C/G	60	28	0,71 (0,36-1,39)	C/A	52	17	0,49 (0,25-0,96)*
		A2/A2	7	3	0,80 (0,20-3,25)	C/C	24	11	0,70 (0,29-1,67)	A/A	5	2	0,60 (0,11-3,25)
		A1/A2+A2/A2	35	18	0,96 (0,49-1,88)	C/G +C/C	84	39	0,71 (0,38-1,33)	C/A+A/A	57	19	0,50 (0,27-0,96)*

*Teste de Fisher $p < 0,05$

APÊNDICE F: Análise de interação dos fatores de risco com os genótipos dos SNP comparando o grupo controle vs subgrupo HSIL+câncer.

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Fumo	Não	A1/A1	55	56	1,00	G/G	25	27	1,00	C/C	53	65	1,00
		A1/A2	21	20	0,94 (0,46-1,92)	C/G	42	31	0,68 (0,33-1,40)	C/A	32	18	0,46 (0,23-0,91)*
		A2/A2	4	6	1,47 (0,39-5,51)	C/C	11	23	1,94 (0,79-4,77)	A/A	5	1	0,16 (0,02-1,44)
		A1/A2+A2/A2	25	26	1,02 (0,53-1,98)	C/G +C/C	21	45	1,98 (0,93-4,21)	C/A+A/A	37	19	0,42 (0,22-0,81)*
	Sim	A1/A1	54	61	1,00	G/G	23	37	1,00	C/C	50	58	1,00
		A1/A2	19	26	1,21 (0,60-2,43)	C/G	38	37	0,61 (0,30-1,21)	C/A	33	30	0,78 (0,42-1,46)
		A2/A2	4	3	0,66 (0,14-3,10)	C/C	16	17	0,66 (0,28-1,56)	A/A	6	4	0,57 (0,15-2,15)
		A1/A2+A2/A2	23	29	1,12 (0,58-2,16)	C/G +C/C	17	29	1,06 (0,48-2,34)	C/A+A/A	39	34	0,75 (0,41-1,36)
História familiar de câncer	Não	A1/A1	28	33	1,00	G/G	15	33	1,00	C/C	58	65	1,00
		A1/A2	48	36	0,64 (0,33-1,24)	C/G	19	36	0,86 (0,38-1,97)	C/A	42	24	0,51 (0,28-0,94)*
		A2/A2	18	22	1,04 (0,47-2,31)	C/C	5	22	2,00 (0,64-6,30)	A/A	10	4	0,36 (0,11-1,20)
		A1/A2+A2/A2	66	58	0,75 (0,40-1,38)	C/G +C/C	24	58	1,10 (0,51-2,38)	C/A+A/A	52	28	0,48 (0,27-0,86)*
	Sim	A1/A1	20	31	1,00	G/G	20	31	1,00	C/C	44	58	1,00
		A1/A2	30	32	0,69 (0,32-1,46)	C/G	25	32	0,83 (0,38-1,78)	C/A	22	24	0,83 (0,41-1,66)
		A2/A2	9	18	1,29 (0,49-3,43)	C/C	9	18	1,29 (0,49-3,43)	A/A	1	1	0,76 (0,05-12,47)
		A1/A2+A2/A2	39	50	0,83 (0,41-1,67)	C/G +C/C	34	50	0,95 (0,46-1,93)	C/A+A/A	23	25	0,82 (0,41-1,64)
DST prévia	Não	A1/A1	85	65	1,00	G/G	36	36	1,00	C/C	79	70	1,00
		A1/A2	29	24	1,08 (0,58-2,03)	C/G	63	35	0,56 (0,30-1,03)	C/A	50	25	0,56 (0,32-1,01)
		A2/A2	6	4	0,87 (0,24-3,22)	C/C	21	23	1,10 (0,52-2,32)	A/A	9	2	0,25 (0,05-1,20)
		A1/A2+A2/A2	35	28	1,05 (0,58-1,89)	C/G+C/C	84	58	0,69 (0,39-1,22)	C/A+A/A	59	27	0,52 (0,30-0,90)*
	Sim	A1/A1	24	51	1,00	G/G	12	28	1,00	C/C	24	51	1,00
		A1/A2	10	20	0,94 (0,38-2,32)	C/G	16	30	0,80 (0,32-1,99)	C/A	14	23	0,77 (0,34-1,76)
		A2/A2	2	5	1,18 (0,21-6,51)	C/C	6	17	1,21 (0,38-3,84)	A/A	2	2	0,47 (0,06-3,54)
		A1/A2+A2/A2	12	25	0,98 (0,42-2,28)	C/G +C/C	22	47	0,92 (0,39-2,13)	C/A+A/A	16	25	0,74 (0,33-1,63)

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Número de parceiros	A1/A1	89	83	1,00	G/G	39	44	1,00	C/C	85	81	1,00	
	<5	A1/A2	32	26	0,87 (0,48-1,58)	C/G	69	45	0,58 (0,33-1,02)	C/A	55	35	0,67 (0,40-1,13)
	A2/A2	7	7	1,07 (0,36-3,19)	C/C	20	26	1,15 (0,56-2,38)	A/A	9	3	0,35 (0,09-1,34)	
	A1/A2+A2/A2	39	34	0,93 (0,54-1,62)	C/G +C/C	89	71	0,71 (0,42-1,20)	C/A+A/A	64	38	0,62 (0,38-1,03)	
	≥ 5	A1/A1	20	29	1,00	G/G	9	19	1,00	C/C	18	36	1,00
		A1/A2	8	17	1,47 (0,53-4,04)	C/G	11	20	0,86 (0,29-2,54)	C/A	10	11	0,55 (0,20-1,54)
		A2/A2	1	2	1,38 (0,12-16,26)	C/C	7	10	0,68 (0,19-2,36)	A/A	2	2	0,50 (0,07-3,85)
A1/A2+A2/A2		9	19	1,46 (0,55-3,86)	C/G +C/C	18	30	0,79 (0,29-2,11)	C/A+A/A	12	13	0,54 (0,21-1,43)	
Gestações	A1/A1	101	106	1,00	G/G	44	58	1,00	C/C	98	113	1,00	
	<5	A1/A2	37	39	1,00 (0,59-1,70)	C/G	75	58	0,59 (0,35-0,99)*	C/A	58	41	0,61 (0,38-0,99)*
	A2/A2	8	8	0,95 (0,34-2,63)	C/C	26	37	1,08 (0,57-2,04)	A/A	10	3	0,26 (0,07-0,97)*	
	A1/A2+A2/A2	45	47	0,99 (0,61-1,63)	C/G +C/C	101	95	0,71 (0,44-1,16)	C/A+A/A	68	44	0,56 (0,35-0,89)*	
	≥ 5	A1/A1	8	12	1,00	G/G	4	7	1,00	C/C	5	11	1,00
		A1/A2	3	7	1,56 (0,31-7,87)	C/G	5	10	1,14 (0,22-5,84)	C/A	7	7	0,45 (0,10-2,01)
		A2/A2	0	1	---	C/C	1	3	1,71 (0,13-22,51)	A/A	1	2	0,91 (0,07-12,52)
A1/A2+A2/A2		3	8	1,78 (0,36-8,81)	C/G +C/C	6	13	1,24 (0,26-5,91)	C/A+A/A	8	9	0,51 (0,12-2,12)	
Partos	A1/A1	105	113	1,00	G/G	46	62	1,00	C/C	100	117	1,00	
	<5	A1/A2	40	42	0,98 (0,59-1,62)	C/G	78	63	0,60 (0,36-0,99)*	C/A	63	47	0,64 (0,40-1,01)
	A2/A2	8	8	0,93 (0,34-2,56)	C/C	27	38	1,04 (0,56-1,95)	A/A	11	3	0,23 (0,06-0,86)*	
	A1/A2+A2/A2	48	50	0,97 (0,60-1,56)	C/G +C/C	105	101	0,71 (0,45-1,14)	C/A+A/A	74	50	0,58 (0,37-0,90)*	
	≥ 5	A1/A1	4	5	1,00	G/G	2	3	1,00	C/C	2	7	1,00
		A1/A2	0	4	---	C/G	2	5	1,67 (0,15-18,88)	C/A	2	1	0,14 (0,01-2,52)
		A2/A2	0	1	---	C/C	0	2	---	A/A	0	2	---
A1/A2+A2/A2		0	5	---	C/G +C/C	2	7	2,33 (0,22-25,25)	C/A+A/A	2	3	0,43 (0,04-4,64)	

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Método contraceptivo	Não	A1/A1	22	33	1,00	G/G	12	18	1,00	C/C	16	41	1,00
		A1/A2	6	17	1,89 (0,64-5,54)	C/G	10	23	1,53 (0,54-4,34)	C/A	10	14	0,55 (0,20-1,48)
		A2/A2	1	5	3,33 (0,36-30,50)	C/C	5	14	1,87 (0,53-6,55)	A/A	3	2	0,26 (0,04-1,71)
		A1/A2+A2/A2	7	23	2,19 (0,80-5,97)	C/G +C/C	15	37	1,56 (0,60-4,02)	C/A+A/A	13	16	0,48 (0,19-1,22)
	Sim	A1/A1	87	84	1,00	G/G	36	46	1,00	C/C	87	82	1,00
		A1/A2	34	29	0,88 (0,50-1,58)	C/G	70	45	0,50 (0,28-0,89)*	C/A	55	34	0,66 (0,39-1,11)
		A2/A2	7	4	0,59 (0,17-2,10)	C/C	22	26	0,92 (0,45-1,89)	A/A	8	3	0,40 (0,10-1,55)
		A1/A2+A2/A2	41	33	0,83 (0,48-1,44)	C/G +C/C	92	71	0,60 (0,35-1,03)	C/A+A/A	63	37	0,62 (0,38-1,03)
Sexarca	>16	A1/A1	30	35	1,00	G/G	11	20	1,00	C/C	28	48	1,00
		A1/A2	16	25	1,34 (0,60-2,96)	C/G	24	25	0,57 (0,23-1,44)	C/A	21	12	0,33 (0,14-0,78)*
		A2/A2	1	4	3,43 (0,36-32,37)	C/C	9	19	1,16 (0,39-3,43)	A/A	1	4	2,33 (0,25-21,93)
	A1/A2+A2/A2	17	29	1,46 (0,68-3,16)	C/G +C/C	33	44	0,73 (0,31-1,74)	C/A+A/A	22	16	0,42 (0,19-0,94)*	
≤16	A1/A1	92	84	1,00	G/G	48	45	1,00	C/C	75	76	1,00	
	A1/A2	30	23	0,84 (0,45-1,56)	C/G	59	45	0,81 (0,46-1,43)	C/A	44	36	0,81 (0,47-1,39)	
	A2/A2	8	5	0,68 (0,22-2,17)	C/C	24	22	0,98 (0,48-1,98)	A/A	10	1	0,10 (0,01-0,79)*	
	A1/A2+A2/A2	38	28	0,81 (0,46-1,43)	C/G +C/C	83	67	0,86 (0,51-1,45)	C/A+A/A	54	37	0,68 (0,40-1,14)	
Menarca	>13	A1/A1	59	47	1,00	G/G	24	27	1,00	C/C	51	53	1,00
		A1/A2	21	23	1,37 (0,68-2,78)	C/G	38	29	0,68 (0,33-1,41)	C/A	30	19	0,61 (0,31-1,22)
		A2/A2	1	3	3,77 (0,38-37,39)	C/C	17	17	0,89 (0,37-2,12)	A/A	3	2	0,64 (0,10-4,00)
	A1/A2+A2/A2	22	26	1,48 (0,75-2,94)	C/G +C/C	55	46	0,74 (0,38-1,46)	C/A+A/A	33	21	0,61 (0,31-1,20)	
≤13	A1/A1	63	72	1,00	G/G	35	38	1,00	C/C	52	71	1,00	
	A1/A2	25	25	0,88 (0,46-1,68)	C/G	45	41	0,84 (0,45-1,57)	C/A	35	29	0,61 (0,33-1,12)	
	A2/A2	8	6	0,66 (0,22-1,99)	C/C	16	24	1,38 (0,63-3,02)	A/A	8	3	0,27 (0,07-1,09)	
A1/A2+A2/A2	33	31	0,82 (0,45-1,49)	C/G +C/C	61	65	5,44 (2,48-11,95)	C/A+A/A	43	32	0,55 (0,30-0,97)*		

*Teste de Fisher $p < 0,05$

Fator de Risco	Genótipo p53 PIN3	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p53 72C>G	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	Genótipo p21 31C>A	Controle	HSIL+ câncer	OR (IC 95%)	
Etnia	Branca	A1/A1	36	39	1,00	G/G	20	22	1,00	C/C	30	36	1,00
		A1/A2	12	9	0,69 (0,26-1,84)	C/G	21	17	0,74 (0,31-1,78)	C/A	16	12	0,63 (0,26-1,52)
		A2/A2	1	2	1,85 (0,16-21,24)	C/C	6	11	1,67 (0,52-5,34)	A/A	2	1	0,42 (0,04-4,82)
		A1/A2+A2/A2	13	11	0,78 (0,31-1,96)	C/G +C/C	27	18	0,61 (0,26-1,42)	C/A+A/A	18	13	0,60 (0,25-1,43)
	Não branca	A1/A1	86	78	1,00	G/G	39	42	1,00	C/C	73	86	1,00
		A1/A2	34	39	1,26 (0,73-2,20)	C/G	62	52	0,78 (0,44-1,38)	C/A	49	36	0,62 (0,37-1,06)
		A2/A2	8	7	0,96 (0,33-2,78)	C/C	27	30	1,03 (0,52-2,03)	A/A	9	4	0,38 (0,11-1,28)
		A1/A2+A2/A2	42	46	1,21 (0,72-2,03)	C/G +C/C	89	82	0,86 (0,50-1,45)	C/A+A/A	58	40	0,59 (0,35-0,97)*
Educação formal	> Ensino Fund	A1/A1	34	36	1,00	G/G	21	18	1,00	C/C	35	44	1,00
		A1/A2	18	24	1,26 (0,58-2,72)	C/G	23	25	1,27 (0,54-2,96)	C/A	13	18	1,10 (0,48-2,55)
		A2/A2	2	1	0,47 (0,04-5,45)	C/C	9	19	2,46 (0,89-6,78)	A/A	6	2	0,27 (0,05-1,40)
		A1/A2+A2/A2	20	25	1,18 (0,56-2,50)	C/G +C/C	32	44	1,60 (0,74-3,49)	C/A+A/A	19	20	0,84 (0,39-1,81)
	≤ Ensino Fund	A1/A1	88	81	1,00	G/G	38	45	1,00	C/C	68	78	1,00
		A1/A2	28	24	0,93 (0,50-1,74)	C/G	60	45	0,63 (0,35-1,13)	C/A	52	30	0,50 (0,29-0,88)*
		A2/A2	7	8	1,24 (0,43-3,58)	C/C	24	22	0,77 (0,38-1,59)	A/A	5	3	0,52 (0,12-2,27)
		A1/A2+A2/A2	35	32	0,99 (0,56-1,75)	C/G +C/C	84	67	0,63 (0,39-1,15)	C/A+A/A	57	33	0,50 (0,29-0,86)*

*Tete de Fisher $p < 0,05$

ANEXO C: Carta de aceite do artigo intitulado "Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16(Ink4a), p21(WAF1) and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia" para publicação na revista *International Journal of Gynecological Pathology*.

-----Mensagem Original -----

Assunto: IJGP

Decision

De: "International Journal of Gynecological Pathology" <ijgynpath@virginia.edu>

Data: Qua, Agosto 15, 2012 4:43 pm

Para: "Jacyara Maria Brito Macedo" <jacyara@uerj.br>

Ref.: Ms. No. IJGP12-1972R1

Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16(Ink4a), p21(WAF1) and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia
International Journal of Gynecological Pathology

Dear Mrs Jacyara Macedo Macedo,

I am pleased to inform you that your paper entitled above has been accepted for publication in The International Journal of Gynecological Pathology. The manuscript and illustrations will be forwarded to our publishers. They will contact you concerning page proofs, reprints, and a quote if you submitted color figures. When you receive the proofs, please review them with care and return them to the publisher as promptly as possible. This will help assure the overall quality and timely publication of your work.

The editorial Office would also like to remind you on behalf of the Society that if an author (usually the first author) of the paper is 40 years or younger, they are eligible for the Robert E. Scully Young Investigator Award. The author must be nominated by an active member of the Society. Self-nominations will not be accepted. The prize consists of a monetary award of \$1,000.00 and an award plaque.

Details on the nomination process can be found on the International Society of Gynecological Pathologists website (www.isgyp.com) - click on AWARDS at top of home page.

I wish to thank you for your excellent contribution and look forward to receiving additional work from you in the future.

Thank you for your interest and support of The International Journal of Gynecological Pathology.

With kind regards,

Leslie B. Thacker

Managing Editor

International Journal of Gynecological Pathology

APÊNDICE G: Resultados detalhados dos SNPs para o grupo de casos

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 1	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 2	HSIL	A1/A1	G/C	C/T
P 3	LSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 4	HSIL	A1/A2	C/C	.
P 5	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 6	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 7	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 8	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 9	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 10	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 11	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 12	HSIL	A1/A1	G/G	A/A
P 13	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 14	HSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 15	HSIL	A1/A2	G/G	C/C
P 17	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 18	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 19	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 21	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 22	HSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 23	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 24	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 25	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 26	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 28	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 29	HSIL	A1/A2	G/C	A/A
P 30	Adenoca	A1/A2	C/C	C/C
P 31	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 32	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 34	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 35	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 36	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 37	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 38	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 39	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 40	HSIL	A1/A1	G/C	A/A
P 41	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 43	LSIL	.	.	C/C
P 44	HSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 45	HSIL	A1/A1	G/G	C/A

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 47	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 48	LSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 49	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 50	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 51	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 52	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/A
P 53	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 54	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 55	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 56	LSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 58	HSIL	A1/A2	G/G	C/C
P 59	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 60	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 61	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 62	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 63	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 64	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 65	HSIL	A1/A1	C/C	C/A
P 66	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 67	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 68	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 69	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 70	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 71	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 73	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 74	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 75	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 77	HSIL	.	.	.
P 78	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 79	HSIL	A1/A2	G/C	A/A
P 80	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 83	LSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 86	HSIL	A1/A2	G/C	A/A
P 87	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 88	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 89	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 90	Ca Escam	A1/A1	G/G	C/A
P 91	Ca Escam	A1/A1	C/C	C/C
P 92	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 93	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 94	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 95	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 96	LSIL	A1/A2	G/C	C/C

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 97	HSIL	A2/A2	G/C	C/C
P 98	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 99	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 100	Adenoca	A1/A1	G/G	C/A
P 101	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 102	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 103	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 104	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 105	LSIL	A1/A1	C/C	C/A
P 106	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 107	Ca Escam	A1/A2	G/C	C/C
P 108	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 109	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 110	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 111	LSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 112	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
P 113	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 115	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 116	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 117	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 118	HSIL	.	.	.
P 119	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 120	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 121	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 122	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 123	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 124	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 125	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 126	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 127	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 128	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 129	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
P 130	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 132	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 133	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 134	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 135	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 136	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 137	HSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 138	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 140	Ca Escam	A1/A1	G/G	C/C
P 143	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 144	HSIL	A1/A1	G/G	C/A

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 145	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 146	Ca Escam	A1/A2	C/C	C/A
P 147	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 148	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 149	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 150	Inflamação	.	.	C/C
P 151	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 152	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 154	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 155	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 156	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 157	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 158	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 159	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 160	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 161	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 163	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 164	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
P 165	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 166	HSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 168	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 169	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 170	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 171	HSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 172	LSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 173	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 174	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 175	.	A1/A2	G/C	C/C
P 176	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 177	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 179	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 180	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 182	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 183	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 184	LSIL	A1/A2	G/G	C/C
P 185	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 186	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 187	HSIL	A1/A1	.	.
P 188	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 189	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 190	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 191	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 192	LSIL	A1/A1	G/G	C/C

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 193	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 195	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 196	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 197	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 198	LSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 199	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
P 200	Ca Escam	A1/A2	G/C	C/C
P 201	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 203	LSIL	A1/A1	.	.
P 204	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 205	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 206	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 207	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 208	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 209	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 210	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
P 211	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 212	HSIL	A1/A2	C/C	C/A
P 214	HSIL	.	.	.
P 215	LSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 217	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 218	HSIL	A1/A2	C/C	A/A
P 220	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 221	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 222	HSIL	.	G/G	C/A
P 223	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 224	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 225	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 226	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 227	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 228	HSIL	.	.	C/C
P 229	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
P 230	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 231	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 233	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 234	Ca Escam	A2/A2	C/C	C/C
P 235	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 236	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 237	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 238	HSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 239	HSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 240	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 241	HSIL	A1/A2	G/C	C/A

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 242	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 243	LSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 244	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 245	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 246	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
P 247	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 248	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 251	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/A
P 252	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
P 253	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 254	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 256	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
P 257	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 258	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 261	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 262	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 263	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 264	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
P 265	Ca Escam	A1/A2	G/C	C/A
P 266	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 268	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 269	Inflamação	.	.	.
P 271	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 273	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 274	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 275	LSIL	A1/A1	G/C	.
P 276	LSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 277	LSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 278	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 279	HSIL	A1/A2	G/G	C/C
P 280	HSIL	A1/A2	G/C	C/C
P 281	HSIL	A2/A2	C/C	C/C
P 282	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 283	HSIL	.	.	.
P 284	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 285	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
P 286	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 287	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 289	LSIL	A1/A2	G/G	C/C
P 290	LSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 291	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 292	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 293	HSIL	A1/A1	G/G	C/A

Casos	Laudo Histopatológico	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
P 294	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 296	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
P 297	HSIL	A1/A1	G/G	C/C
P 298	HSIL	A2/A2	C/C	C/A
P 300	LSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 301	HSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 302	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
P 303	HSIL	A1/A1	C/C	C/C
P 304	HSIL	A1/A2	C/C	C/C
P 306	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 307	HSIL	A1/A1	G/C	C/A
P 308	HSIL	A1/A1	G/G	C/A
P 309	HSIL	.	.	.
P 310	LSIL	A1/A1	G/C	C/C
P 311	Ca Escam	.	.	.
P 312	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 313	HSIL	A1/A2	G/C	C/A
P 314	Ca Escam	A1/A1	G/G	A/A
P 315	Ca Escam	A1/A1	G/G	C/C
P 316	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 317	Ca Escam	A1/A2	G/C	C/C
P 318	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 319	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 320	Ca Escam	A1/A1	G/C	C/C
P 321	Ca Escam	A1/A2	C/C	C/C
P 324	Ca Escam	A1/A2	G/C	C/A

APÊNDICE H: Resultados detalhados dos SNPs para o grupo controle

Controle	Laudo de Citologia	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
C 2	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 4	Inflamação	A1/A1	C/C	C/A
C 5	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 6	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 7	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 9	Inflamação	.	.	C/C
C 10	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 11	Inflamação	A1/A2	C/C	C/A
C 12	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 13	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 14	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 16	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 17	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 18	Inflamação	A1/A1	G/C	.
C 19	Inflamação	.	.	A/A
C 20	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 21	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 22	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 23	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 24	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 25	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 26	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 28	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 29	Inflamação	.	G/C	.
C 33	Inflamação	A1/A1	.	C/C
C 34	Inflamação	A1/A2	C/C	C/A
C 35	Inflamação	.	.	C/C
C 38	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 39	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 40	Inflamação	.	G/C	.
C 41	Inflamação	A2/A2	C/C	C/C
C 42	Inflamação	A2/A2	C/C	C/C
C 43	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 44	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 48	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 49	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 50	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 51	Inflamação	A2/A2	G/G	.
C 52	Inflamação	A1/A1	.	C/C
C 53	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 54	Inflamação	A1/A1	G/G	.

Controle	Laudo de Citologia	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
C 55	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 56	Inflamação	A1/A1	.	C/C
C 57	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 59	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 61	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 62	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 64	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 66	Inflamação	A1/A2	C/C	C/A
C 67	Inflamação	A1/A2	.	C/C
C 68	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 69	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 71	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 72	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 74	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 75	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 77	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 78	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 79	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 80	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 81	Inflamação	A1/A1	C/C	C/A
C 82	Inflamação	A1/A1	G/C	A/A
C 84	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 85	Inflamação	A1/A1	C/C	C/C
C 86	.	A1/A1	G/C	C/C
C 87	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 88	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 89	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 93	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 95	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 97	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 98	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 99	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 100	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 101	Inflamação	A1/A1	G/C	A/A
C 102	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 103	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 105	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 108	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 109	Inflamação	A1/A1	G/G	A/A
C 110	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 111	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 112	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 114	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C

Controle	Laudo de Citologia	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
C 115	.	A2/A2	C/C	A/A
C 117	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 118	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 119	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 121	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 122	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 123	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 125	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 126	Inflamação	A1/A2	C/C	C/A
C 128	Inflamação	A1/A1	C/C	C/A
C 129	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 130	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 132	Inflamação	A2/A2	C/C	C/A
C 133	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 134	Inflamação	A1/A1	C/C	C/A
C 137	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 138	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 144	.	A1/A1	G/C	C/C
C 145	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 147	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 150	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 151	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 152	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 153	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 154	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 155	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 156	Inflamação	A1/A1	G/C	A/A
C 157	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 159	Inflamação	A1/A1	G/C	A/A
C 160	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 161	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 164	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 166	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 167	Inflamação	A1/A1	C/C	C/C
C 169	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 171	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 172	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 174	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 175	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 176	Inflamação	A2/A2	C/C	C/C
C 177	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 178	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 180	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A

Controle	Laudo de Citologia	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
C 183	Inflamação	A1/A1	.	C/A
C 185	.	A1/A1	G/G	C/A
C 186	Inflamação	.	.	C/A
C 187	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 189	Inflamação	.	.	C/A
C 190	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 191	Inflamação	.	G/G	C/C
C 192	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 194	Inflamação	A1/A1	G/G	.
C 195	.	A1/A2	G/C	C/C
C 196	Inflamação	A2/A2	G/C	C/C
C 197	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 199	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 200	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 202	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 203	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 204	Inflamação	A1/A1	G/C	A/A
C 205	.	A1/A2	G/C	C/A
C 206	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 207	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 209	Inflamação	A2/A2	C/C	A/A
C 211	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 212	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 213	Inflamação	A1/A1	C/C	C/A
C 215	Inflamação	A1/A1	C/C	C/C
C 216	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 217	Inflamação	A1/A1	C/C	C/A
C 220	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 223	.	A1/A1	C/C	C/A
C 224	.	A1/A1	C/C	C/A
C 229	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 233	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 234	.	A1/A1	G/C	C/C
C 235	.	A1/A2	C/C	C/C
C 239	Inflamação	A1/A2	G/C	C/A
C 240	Inflamação	A1/A2	C/C	C/A
C 241	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 246	Inflamação	A1/A2	G/C	C/C
C 249	Inflamação	A1/A2	C/C	C/A
C 251	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 255	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 258	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 259	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A

Controle	Laudo de Citologia	p53 PIN3	p53 72 C>G	p21 31 C>A
C 260	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 261	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 262	Inflamação	A2/A2	C/C	C/C
C 263	Inflamação	A1/A1	G/G	A/A
C 264	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 267	Inflamação	A1/A2	C/C	C/C
C 270	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 271	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 272	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 273	Inflamação	A1/A1	G/G	A/A
C 277	Inflamação	A1/A1	G/C	C/C
C 279	Inflamação	A1/A1	G/G	C/C
C 280	Inflamação	A1/A1	G/C	C/A
C 283	Inflamação	A1/A1	G/G	C/A
C 284	Inflamação	A1/A2	G/C	CC

Casos	Laudo Histopatológico	p53 +	p53 L	p21 +	p21 L	p16 +	p16 L	cicl +	cicl L	Ki67 +	Ki67 L	HPV pool	HPV 16
P 38	HSIL	1	1	1	3	1	3	0	0	1	3	1	1
P 39	HSIL
P 40	HSIL	1	2	1	3	1	1	0	0	1	1	1	0
P 41	HSIL	1	1	1	2	1	1	1	1
P 43	LSIL	1	1	1	1	0	0	.	.	1	1	1	0
P 44	HSIL
P 45	HSIL	1	1	1	3	1	2	.	.	1	3	1	1
P 47	LSIL	0	0	0	0	0	0
P 48	LSIL	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	1	1
P 49	HSIL	1	1	1	2	1	2	1	1	.	.	1	1
P 50	HSIL
P 51	LSIL
P 52	Ca Escam
P 53	HSIL	1	1	1	2	1	3	0	0	1	3	1	0
P 54	HSIL
P 55	LSIL	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
P 56	LSIL
P 58	HSIL	1	3	1	3	1	3	0	0	1	2	1	0
P 59	LSIL	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1
P 60	HSIL	1	1	1	2	1	3	1	1
P 61	HSIL	1	3	1	3	1	3	0	0
P 62	HSIL	1	3	1	2	0	0	1	2	1	2	1	1
P 63	HSIL	1	1	1	3	1	2	0	0	1	2	1	1
P 64	LSIL
P 65	HSIL
P 66	LSIL	1	1	1	1	0	0	1	1
P 67	HSIL	1	3	0	0	1	2	0	0	1	2	1	1
P 68	LSIL
P 69	HSIL	1	1	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1
P 70	HSIL	1	2	1	3	1	2	1	1	1	2	1	1
P 71	LSIL
P 73	HSIL
P 74	HSIL
P 75	HSIL
P 77	HSIL	1	2	1	3	1	3	0	0	1	3	1	1

Casos	Laudo Histopatológico	p53 +	p53 L	p21 +	p21 L	p16 +	p16 L	cicl +	cicl L	Ki67 +	Ki67 L	HPV pool	HPV 16
P 78	LSIL
P 79	HSIL	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3	1	1
P 80	LSIL	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1
P 83	LSIL
P 86	HSIL	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
P 87	HSIL	0	0	0	0	0	0	1	0
P 88	HSIL
P 89	HSIL	1	1	0	0	0	0	.	.	1	1	1	1
P 90	Ca Escam
P 91	Ca Escam	1	2	1	3	1	3	1	1
P 92	LSIL	1	3	1	3	1	2	1	2	1	3	1	0
P 93	LSIL	1	3	1	2	1	3	0	0	1	3	1	1
P 94	HSIL	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1
P 95	HSIL	1	2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
P 96	LSIL	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1
P 97	HSIL	1	1	1	2	1	3	1	1	1	2	1	1
P 98	HSIL	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
P 99	HSIL	1	2	1	2	1	2	0	0	1	3	1	1
P 100	Adenoca	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2	1	1
P 101	HSIL
P 102	HSIL	1	.	1	.	1	.	0	0	1	.	1	0
P 103	HSIL	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2	1	1
P 104	HSIL	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1
P 105	LSIL
P 106	HSIL	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3	1	1
P 107	Ca Escam
P 108	LSIL	1	2	0	0	1	2	0	0
P 109	HSIL
P 110	HSIL	0	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
P 111	LSIL	1	2	1	3	1	2	1	1	1	3	1	1
P 112	Inflamação	1	2	1	3	1	3	1	1	1	2	1	1
P 113	LSIL
P 115	LSIL	1	3	1	3	0	0	1	0
P 116	LSIL	1	3	1	3	1	2	0	0	1	3	1	1
P 117	HSIL	1	2	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1

Casos	Laudo Histopatológico	p53 +	p53 L	p21 +	p21 L	p16 +	p16 L	cicl +	cicl L	Ki67 +	Ki67 L	HPV pool	HPV 16
P 118	HSIL	1	1	1	2	0	0	1	1
P 119	LSIL	1	2	1	1	1	2	0	0	1	2	1	1
P 120	HSIL	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	1
P 121	LSIL	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1
P 122	LSIL	1	1	1	2	1	2	0	0	1	3	1	1
P 123	LSIL	1	1	1	3	0	0	0	0	1	3	1	1
P 124	LSIL
P 125	HSIL	1	1	1	2	0	0	1	1	1	2	1	1
P 126	LSIL	1	1	.	.	0	0
P 127	HSIL	1	2	1	3	1	2	1	1	1	2	1	1
P 128	LSIL	1	3	1	0
P 129	Inflamação	1	3	1	2	1	2	1	1
P 130	HSIL
P 132	LSIL	1	2	1	2	1	3	0	0	1	2	1	1
P 133	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	0	0	1	2	1	0
P 134	LSIL	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1
P 135	HSIL	1	3	1	3	1	3	1	1
P 136	HSIL
P 137	HSIL	0	0	1	2	0	0	1	1	.	.	1	1
P 138	HSIL	1	2	1	3	1	3	0	0	1	3	1	1
P 140	Ca Escam
P 143	HSIL
P 144	HSIL
P 145	HSIL
P 146	Ca Escam
P 147	HSIL
P 148	HSIL	1	3	1	2	0	0	1	1	1	2	1	1
P 149	HSIL	1	2	1	3	1	2	0	0	1	2	0	0
P 150	Inflamação
P 151	LSIL	1	3	1	2	1	2	1	2	1	3	1	0
P 152	HSIL	1	1	1	3	1	3	0	0	1	3	1	1
P 154	HSIL
P 155	HSIL
P 156	HSIL
P 157	LSIL	1	1	1	1	0	0	0	0	.	.	1	1

Casos	Laudo Histopatológico	p53 +	p53 L	p21 +	p21 L	p16 +	p16 L	cicl +	cicl L	Ki67 +	Ki67 L	HPV pool	HPV 16
P 198	LSIL
P 199	Inflamação
P 200	Ca Escam
P 201	HSIL
P 203	LSIL
P 204	LSIL
P 205	LSIL
P 206	LSIL
P 207	HSIL	0	0	0	0	0	0
P 208	LSIL
P 209	HSIL
P 210	Inflamação	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1
P 211	HSIL	1	2	1	2	0	0	1	2	1	2	1	1
P 212	HSIL	1	1	1	1	1	2	0	0	1	2	1	1
P 214	HSIL	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1
P 215	LSIL	1	3	1	3	1	2
P 217	HSIL
P 218	HSIL	1	2	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1
P 220	HSIL	1	2	1	2	1	2	1	1
P 221	LSIL
P 222	HSIL	1	1	0	0	1	2	0	0
P 223	HSIL
P 224	HSIL
P 225	HSIL	1	3	1	3	1	2	.	.	1	2	1	1
P 226	LSIL	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2	1	1
P 227	LSIL
P 228	HSIL	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	.	.
P 229	Inflamação	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1
P 230	HSIL
P 231	HSIL	1	2	1	2	1	3	1	1	1	2	1	1
P 233	LSIL	1	1	1	2	1	3	.	.	1	2	1	0
P 234	Ca Escam	1	2	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1
P 235	HSIL	1	2	1	3	1	3	1	1	1	2	1	1
P 236	HSIL
P 237	HSIL	1	3	1	2	1	3	1	3	1	3	1	0

Casos	Laudo Histopatológico	p53 +	p53 L	p21 +	p21 L	p16 +	p16 L	cicl +	cicl L	Ki67 +	Ki67 L	HPV pool	HPV 16
P 281	HSIL	1	2	1	2	0	0	.	.	1	2	1	1
P 282	HSIL
P 283	HSIL	0	0	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1
P 284	LSIL
P 285	Inflamação
P 286	HSIL
P 287	HSIL	1	1	1	2	1	1	.	.	1	1	1	0
P 289	LSIL	1	2	1	3	1	3	0	0	1	3	0	0
P 290	LSIL	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1	1	1
P 291	LSIL
P 292	HSIL	1	3	1	3	0	0	1	1	1	1	1	1
P 293	HSIL	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
P 294	HSIL	1	3	0	0	0	0	1	1
P 296	Inflamação	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1
P 297	HSIL	1	2	1	3	1	2	1	2	1	3	1	1
P 298	HSIL
P 300	LSIL
P 301	HSIL	1	1	1	2	1	2	0	0	1	3	.	.
P 302	Inflamação	1	3	1	3	1	3	0	0	1	2	1	1
P 303	HSIL
P 304	HSIL	1	1	0	0	1	3	0	0	1	2	1	1
P 306	HSIL	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1
P 307	HSIL	1	2	1	3	1	2	1	1	1	2	1	1
P 308	HSIL	1	2	1	2	0	0	1	2	1	1	1	1
P 309	HSIL	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1
P 310	LSIL
P 311	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	0	0	1	3	1	0
P 312	Ca Escam	1	1
P 313	HSIL	0	0	0	0
P 314	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	0	0	1	3	1	1
P 315	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	.	.	1	3	1	0
P 316	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	1	1	1	3	1	1
P 317	Ca Escam	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3	1	0
P 318	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	1
P 319	Ca Escam	1	3	1	3	1	2	1	2	1	3	1	1

Casos	Laudo Histopatológico	p53 +	p53 L	p21 +	p21 L	p16 +	p16 L	cicl +	cicl L	Ki67 +	Ki67 L	HPV <i>pool</i>	HPV 16
P 320	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	0	0	1	3	1	0
P 321	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	0
P 324	Ca Escam	1	3	1	3	1	3	0	0	1	3	1	0

+ = positividade imunohistoquímica (0 = negativo e 1 = positivo); L = nível de positividade em relação à distribuição epitelial (1+, terço inferior da espessura do epitélio; 2+, dois-terços inferiores da espessura do epitélio; 3+, mais de dois-terços podendo comprometer toda a espessura do epitélio); HPV *pool* e HPV 16, 0 = negativo e 1 = posi

